



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Mirella Crhistine Scariot

Lactobacillus paracasei EM IOGURTE ARTESANAL:
MONITORAMENTO DA VIABILIDADE CELULAR E CAPACIDADE DE
BIOCONTROLE CONTRA OS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PATÓGENOS
DE ORIGEM ALIMENTAR

Florianópolis,

2020

Mirella Crhistine Scariot

Lactobacillus paracasei EM IOGURTE ARTESANAL:
MONITORAMENTO DA VIABILIDADE CELULAR E CAPACIDADE DE
BIOCONTROLE CONTRA OS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PATÓGENOS
DE ORIGEM ALIMENTAR

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Ana Carolina Maissonave Arisi, Dra.

Coorientadora: Prof. Dra. Mieke Uyttendaele, Dra.

Florianópolis,
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Scariot, Mirella Crhistine
Lactobacillus paracasei em iogurte artesanal:
monitoramento da viabilidade celular e capacidade de
biocontrole contra os principais microrganismos patógenos
de origem alimentar / Mirella Crhistine Scariot ;
orientador, Ana Carolina Maisonnave Arisi, coorientador,
Mieke Uyttendaele , 2020.
155 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Biologia Molecular. 3.
qPCR. 4. Probióticos. 5. Atividade antimicrobiana . I.
Maisonnave Arisi, Ana Carolina . II. Uyttendaele , Mieke.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. IV. Título.

Mirella Crhistine Scariot

***Lactobacillus paracasei* em iogurte artesanal:
monitoramento da viabilidade celular e capacidade de biocontrole contra os
principais microrganismos patógenos de origem alimentar**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Adriano Brandelli, Dr.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Thaís Marques Sincero, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Elane Schwinden Prudêncio, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciência dos Alimentos.

Prof.^a Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.

Coordenadora do Programa

Prof.^a Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2020

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao universo e toda sua energia por ter me guiado até aqui num caminho repleto de alegrias e superações e pelo presente de cruzar o meu caminho com tantas pessoas incríveis.

A minha orientadora prof. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi pela oportunidade, confiança e amizade ao longo de quase 10 anos sob sua orientação. Muito além de ensinamentos profissionais, agradeço pelos conselhos e aprendizados diários. Serei eternamente grata pela confiança depositada em mim e no meu trabalho.

A minha coorientadora Prof. Dra. Mieke Uyttendaele e a Universidade de Ghent pela maior oportunidade da minha vida durante a realização do estágio de doutorado sanduíche no exterior. Foram 6 meses de aprendizados diários que foram muito além do profissional, dos quais lembrarei para sempre com muito carinho.

Aos meus pais, Carlos e Jane, por sempre fazerem o possível e o impossível para que tivéssemos as melhores oportunidades. Agradeço por confiarem em mim e por sempre me apoiarem e darem forças quando nada parecia fazer sentido. Sempre foi e sempre será por e para vocês.

As minhas irmãs, Halline e Thays, por serem o meu porto seguro em todos os momentos da minha vida. E aos meus sobrinhos e afilhados, Vicente e Benício, que desde que chegaram me ensinam que o amor é e sempre será a resposta para tudo.

Ao meu marido Jonathan por todo o amor e companheirismo. Obrigada por me incentivar todos os dias a ser melhor, por entender meus horários nada regrados e por entender minha ausência durante infinitos experimentos e artigos. E a minha filha de quatro patas, Cacau, que sem saber me revigora todos os dias.

A minha querida amiga e fiel escudeira Gabriela Barbosa Rossi, meu grande presente desde a graduação. Obrigada pela parceria e amizade ao longo de tantos anos, pela ajuda em todos os experimentos e por tanto apoio nos dias cinzentos.

Aos meus queridos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular: Ana Marina, Anita, Elisandra, Franciele, Karina, Leonardo, Lorena, Lúcia, Nicole e Tuany por compartilharem lindos momentos. E também aos amigos que já deixaram o grupo, mas que estarão para sempre no meu coração: Diana, Helena, Pâmela, Gustavo, Vanessa, Fernanda, Cibele, Fábio, Pedro, Geisi, Joana, Carla, Maryela, Kelly e Tomás.

A professora Elane Prudêncio e ao Laboratório de Leites e Derivados pelo apoio, parceria e suporte na realização dos trabalhos.

A professora e amiga Isabela Maia Toaldo pela amizade, companheirismo e pela disposição em sempre sanar nossas dúvidas.

As minhas melhores amigas Bruna, Beatriz, Ana Carolina, Maria Eduarda e Isabela por tanto apoio e incentivo sempre me erguendo e mostrando o real sentido da palavra amizade.

Aos professores, servidores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos pelos aprendizados, disposição em sempre nos ajudar e ótimos momentos compartilhados.

A UFSC e a CAPES pela oportunidade da realização desse trabalho.

Muito obrigada a todos que contribuíram na realização desse sonho!

RESUMO

SCARIOT, M. C. ***Lactobacillus paracasei* em iogurte artesanal: monitoramento da viabilidade celular e capacidade de biocontrole contra os principais microrganismos patogênicos de origem alimentar.** 2020. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Bactérias ácido lácticas (BAL), como *Lactobacillus paracasei*, têm sido frequentemente adicionadas a diversas matrizes alimentares devido ao potencial probiótico, as propriedades antimicrobianas e as inúmeras características tecnológicas que apresentam. Alimentos fermentados, como iogurtes, têm sido usados como veículo para a incorporação de tais estirpes, pois proporcionam um bom ambiente para o crescimento e proliferação das bactérias. Produtos fermentados são geralmente considerados seguros, pois têm baixo pH e essa característica não favorece o crescimento de bactérias patogênicas de origem alimentar. No entanto, estudos recentes têm evidenciado a sobrevivência e a capacidade de proliferação de microrganismos patogênicos nesses ambientes. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi utilizar uma cepa de *L. paracasei* como potencial probiótico e agente de biocontrole em amostras de iogurte artesanal. Para isso, foi desenvolvido um ensaio molecular, baseado em PCR quantitativa (qPCR) combinado com monoazida de propídio (PMA), um corante intercalante de DNA, afim de diferenciar e quantificar as células viáveis de *L. paracasei*. Além disso, foram desenvolvidos iniciadores espécie-específicos para a detecção e quantificação de *L. paracasei* por qPCR e investigou-se a capacidade de biocontrole de *L. paracasei* contra microrganismos patogênicos de origem alimentar em amostras de iogurte artesanal. Primeiramente, *L. paracasei* foi cultivado em meio de cultura e submetido à tratamento térmico a 60 °C por diferentes períodos de tempo e iogurte contendo *L. paracasei* foi preparado e armazenado a 4 °C por 30 dias. As células viáveis foram quantificadas usando ensaios qPCR e PMA-qPCR tendo como alvo o gene *tuf* e também por contagem em placa. Curvas padrões foram preparadas e a eficiência média obtida foi de 94 % e 96 % ($R^2 > 0.98$) para *L. paracasei* em meio de cultura e iogurte armazenado por um dia, respectivamente. O limite de detecção (LOD) para ambas as amostras foi de 10^4 cópias do genoma, correspondendo a 32.1 pg de DNA. Os resultados de contagem obtidos para *L. paracasei* tratado termicamente foram concordantes pelos métodos PMA-qPCR e contagem em placa. O valor de UFC reduziu conforme o tempo do tratamento térmico aumentou, enquanto a contagem por qPCR se manteve constante. A enumeração de *L. paracasei* obtida por qPCR para iogurte suplementado com a cepa potencialmente probiótica armazenado por um dia e 30 dias foram maiores do que a enumeração por PMA-qPCR para as mesmas amostras. Os valores de contagem em placa foram similares aos valores de UFC obtidos por PMA-qPCR. Com relação aos iniciadores espécie-específicos, sete pares com diferentes regiões como alvo foram sintetizados. Os pares de iniciadores Lsei1 e Lsei2, cujo alvo é o gene responsável pelo sistema manose/frutose/acetil-galactosamina mostraram resultados satisfatórios, amplificando amostras positivas com Cq médio de 17,43 e 20,83 para cada iniciador, respectivamente. Diferentes estirpes de BAL, incluindo *L. paracasei* e microrganismos patogênicos foram cultivados em caldo MRS e BHI a 37 °C por 24hs, respectivamente. Os microrganismos foram inoculados em placas de 24 poços em concentrações pré-determinadas, afim de avaliar a capacidade das estirpes em sobreviverem e multiplicarem-se sob condições ácidas e de armazenamento a frio. Em condições ácidas (pH 4,0 e 4,5), observou-se que todos os patogênicos e as BAL foram capazes de sobreviver por até 6 horas. Quando a

condição ácida e o armazenamento a frio foram aplicados simultaneamente, foi observado um aumento na contagem bacteriana de todos os microrganismos, demonstrando que a combinação de ambas as condições pode favorecer a multiplicação dos mesmos. Para avaliar a atividade antimicrobiana de 5 estirpes de BAL, dois métodos foram utilizados: ensaio de ágar spot e ensaio de difusão em poço. Dentre as BAL avaliadas, *L. paracasei* subsp. *paracasei* foi a que apresentou o melhor efeito antagônico contra todas as estirpes de patógenos testados. Por isso, essa estirpe foi adicionada à amostra de iogurte artesanal, afim de avaliar a capacidade da estirpe *L. paracasei* em atuar como potencial probiótico e agente de biocontrole. As amostras de iogurte foram pós-contaminadas com 3 diferentes microrganismos patogênicos e armazenadas a 7 e 12 °C. *L. paracasei* subsp. *paracasei* mostrou ser capaz de reduzir a contagem dos 3 patogênicos em níveis consideráveis. Estes estudos mostram que *L. paracasei* e seus compostos extracelulares podem representar uma estratégia eficiente para prevenir surtos de origem alimentar em produtos artesanais, além de demonstrar que abordagens moleculares tem oferecido resultados precisos, confiáveis e mais rápidos quando comparados aos métodos clássicos da microbiologia para a quantificação de células viáveis em alimentos.

Palavras-chave: *Lactobacillus paracasei*; qPCR; PMA; Agente de biocontrole.

ABSTRACT

SCARIOT, M. C. *Lactobacillus paracasei* in artisanal yoghurt: monitoring cell viability and bio-control capacity against major foodborne pathogenic microorganisms. 2020. Thesis (Ph.D. in Food Science), Program of Post-graduation in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis.

Lactic acid bacteria (BAL), such as *Lactobacillus paracasei*, have been frequently added to diverse food matrices due to their probiotic potential, their antimicrobial properties and the numerous technological characteristics they present. Fermented foods, such as yogurt, have been used as a vehicle for incorporating such strains, as they provide a good environment for the growth and proliferation of bacteria. Fermented products are generally considered safe, they have low pH and this characteristic does not favor the growth of foodborne pathogenic bacteria. However, recent studies have shown the survival and the ability of pathogens to proliferate in these environments. In this context, the main objective of this work was to use the bacterium *L. paracasei* as a probiotic microorganism and biocontrol agent in samples of artisanal yogurt. For this, a molecular assay was developed, based on quantitative PCR (qPCR) combined with propidium monoazide, an intercalating DNA dye, in order to differentiate and quantify viable *L. paracasei* cells. In addition, species-specific primers were developed for the detection and quantification of *L. paracasei* by qPCR and the biocontrol capacity of *L. paracasei* against foodborne pathogenic microorganisms in artisanal yogurt samples was investigated. First, *L. paracasei* was grown in culture medium and subjected to heat treatment at 60 ° C for different periods of time and probiotic yogurt containing *L. paracasei* was prepared and stored at 4 ° C for 30 days. Viable cells were quantified using qPCR and PMA-qPCR assays targeting the *tuf* gene and also by plaque counting. Standard curves were prepared and the average efficiency obtained was 94% and 96% ($R^2 > 0.98$) for *L. paracasei* in culture medium and probiotic yogurt stored for one day, respectively. The detection limit (LOD) for both samples was 10^4 copies of the genome, corresponding to 32.1 pg of DNA. The counting results obtained for thermally treated *L. paracasei* were consistent with the PMA-qPCR and plate counting methods. The CFU value decreased as the heat treatment time increased, while the qPCR count remained constant. The enumeration of *L. paracasei* obtained by qPCR for probiotic yogurt stored for one day and 30 days was greater than the enumeration by PMA-qPCR for the same samples. The plate count values were similar to the CFU values obtained by PMA-qPCR. Regarding species-specific primers, seven pairs with different target regions were synthesized. The pairs of primers Lsei1 and Lsei2, whose target is the gene responsible for the mannose / fructose / acetyl-galactosamine system, showed satisfactory results, amplifying positive samples with an average Cq of 17.43 and 20.83 for each primer, respectively. Different strains of BAL, including *L. paracasei* and pathogenic microorganisms were grown in MRS and BHI broth at 37 ° C for 24 hours, respectively. The microorganisms were inoculated in 24-well plates at predetermined concentrations, in order to evaluate the ability of the strains to survive and multiply under acidic conditions and cold storage. Under acidic conditions (pH 4.0 and 4.5), it was observed that all pathogens and BAL were able to survive for up to 6 hours. When the acidic condition and cold storage were applied simultaneously, an increase in the bacterial count of all microorganisms was observed, demonstrating that the combination of both conditions can favor their multiplication. To evaluate the antimicrobial activity of 5 BAL strains, two methods were used: spot agar assay and well diffusion assay. Among the BAL evaluated, *L. paracasei* subsp. *paracasei* showed the best antagonistic effect against

all strains of pathogens tested. Therefore, this strain was added to the artisanal yogurt sample, in order to assess the ability of *L. paracasei* strain to act as a probiotic and biocontrol agent. The yogurt samples were post-contaminated with 3 different pathogens and stored at 7 and 12 ° C. *L. paracasei* subsp. *paracasei* has been shown to be able to reduce the count of the 3 pathogens to considerable levels. These studies show that *L. paracasei* and its extracellular compounds can represent an efficient strategy to prevent food-borne outbreaks in artisanal products, in addition to demonstrating that molecular approaches have offered accurate, reliable and faster results when compared to classic microbiology methods for quantification of viable cells in food.

Keywords: *Lactobacillus paracasei*; qPCR; PMA; Bio-control agent.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Mecanismos de ação dos microrganismos probióticos. **31**

Figura 2: Distribuição dos 10 principais agentes etiológicos identificados em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre os anos 2003 a 2018. **38**

Figura 3: Esquema representativo da reação de células viáveis e não viáveis com monoazida de propídio em conjunto com a técnica qPCR. O DNA de células não viáveis torna-se incapaz de amplificação por qPCR e somente o DNA de células viáveis é detectado. **50**

Figura 4: Esquema ilustrativo do método *Agar spot* para avaliação da atividade antimicrobiana. **54**

Figura 5: Esquema ilustrativo do método de difusão em poço para avaliação da atividade antimicrobiana. **55**

CAPÍTULO II

Figure 1: TUF qPCR assay standard curves (350 nmol/L TUFF and 250 nmol/L TUFR) for *L. paracasei* ATCC 10746 performed in six and three qPCR runs in different days using DNA extracted from (A) *L. paracasei* culture and (B) probiotic yoghurt. **82**

Figure 2: Log DNA copy number of *L. paracasei* ATCC 10746 estimated by qPCR (circles) and PMA-qPCR (triangles). Cultures were submitted to heat treatment for different periods of time. A) qPCR run 1 and DNA extract 1; B) qPCR run 1 and DNA extract 2; C) qPCR run 2 and DNA extract 1; D) qPCR run 2 and DNA extract 2; E) qPCR run 3 and DNA extract 1; F) qPCR run 3 and DNA extract 2. **83**

Figure 3: Comparison of *Lactobacillus paracasei* ATCC 10746 count (log CFU/mL) obtained by qPCR, PMA-qPCR and plate count of probiotic yoghurt samples collected at 1 and 30 day. Each bar represents the mean \pm SD (n = 9) values. **85**

CAPÍTULO III

Figure 1: Growth potential of lactic acid bacteria in MRS broth incubated at 7 and 12 °C. Each bar represents the mean value of three replicates. Columns labelled with upper case letters indicate that the values are significantly different from values at day 0 ($p < 0.05$). **112**

Figure 2: Enumeration of lactic acid bacteria strains and *Enterococcus faecium* incubated in MRS broth at pH 4.5 and stored for up to 14 days at 7 and 12°C. The values represent the mean value of three replicates. **116**

Figure 3: Enumeration of pathogens strains (A - *Escherichia coli*; B – *Listeria* spp.; C – *Salmonella* spp.) grown in culture medium under pH 4.5 and stored during 1, 7 and 14 days at 7 and 12°C. The values represent the mean values (n = 3). **116**

Figure 4: Reduction effect of co-inoculation with *L. paracasei* subsp. *paracasei* probiotic strain during yoghurt production (using standard starter cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) and against the three selected foodborne pathogens inoculated in the yoghurt sample as post-contamination and during further storage at 7°C (A-B-C) and 12°C (D-E-F). (A/a) *E. coli* O157H7 BRMSID188; (B/b) *S. enterica* Typhimurium ATCC SL 1344; (C/c) *L. monocytogenes* LMG 23194. **122**

Figure 5: pH measurements in normal (●) and probiotic (■) yoghurt samples during time of storage at 7 and 12°C. **123**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Critérios de seleção e propriedades desejadas para os microrganismos probióticos. **29**

Tabela 1: Aplicações dos corantes intercalantes de DNA para detecção de células viáveis de bactérias em diferentes matrizes alimentares. **52**

CAPÍTULO II

Table 1: TUF qPCR parameters of standard curves for *L. paracasei* ATCC 10746 quantification. DNA was extracted from *L. paracasei* grown in medium culture and from probiotic yoghurt. **81**

Table 2: Comparison of *L. paracasei* ATCC10746 count (log CFU/mL) obtained by qPCR, PMA- qPCR and plate count of heat-treated culture samples. **85**

CAPÍTULO III

Table 1: Overview of the pathogens and lactic acid bacteria strains used in the present study. **106**

Table 2: Survival of lactic acid bacteria and *Enterococcus faecium* (log CFU.mL⁻¹) during 6h incubation at room temperature in MRS broth under acid conditions (pH 3.5; 4.0 or 4.5). The values represent the mean values (n = 3). **114**

Table 3: Survival of pathogens strains (log CFU.mL⁻¹) during 6h incubation at room temperature in BHI broth under acid conditions (pH 3.5; 4.0 or 4.5). The values represent the mean values (n = 3). **115**

Table 4: Screening of selected lactic acid bacteria strains for antimicrobial activity against the main foodborne pathogens by agar spot assay (ASA) and agar well diffusion assay (AWD) using either acid cell free supernatant (CFS) or neutralized (pH 6.5) cell free supernatant (SFS). The threshold for established antimicrobial activity is a diameter of > 5mm; for each pathogen or surrogate strain the highest antimicrobial activity observed over the five LAB strains included is indicated in bold per test assay. (nd: not detected). **119**

CAPÍTULO IV

Table 1: Primer set designed and tested to detection and specific quantification of *L. paracasei* by qPCR. **139**

Table 2: Mean yield and quality of bacterial DNA extracted from gram-positive samples. **140**

Table 3: Mean yield and quality of bacterial DNA extracted from gram-negative samples. **140**

Table 4: Cq and Tm values generated from the qPCR assay using the tuf primer pair and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target. **142**

Table 5: Cq and Tm values generated from the qPCR assay using primer pairs LpNTR1 and LpNTR2 at concentrations 200 and 300 nmol L⁻¹ and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target. **143**

Table 6: Cq and Tm values generated from the qPCR assay using the Lap1 and Lap2 primer pairs at concentrations 200, 300 and 400 nmol. L⁻¹ and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target. **144**

Table 7: Cq and Tm values generated from the qPCR assay using primer pairs Lsei1, Lsei2 and Lsei3 at concentrations 100 and 300 nmol. L⁻¹ and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target. **145**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactéria ácido láctica
C _q	Ciclo de quantificação
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTA	Doença transmitida por alimento
EFSA	Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos
EMA	Monoazida de etídio (do inglês, <i>ethidium monoazide</i>)
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>)
FNU	Fermento natural de uva
GRAS	Geralmente Reconhecido como seguro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
P _b	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PMA	Monoazida de propídio (do inglês, <i>propidium monoazide</i>)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, <i>messenger ribonucleic acid</i>)
TGI	Trato gastrointestinal
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO I	22
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	23
1.2 GÊNERO <i>Lactobacillus</i>	25
1.3 ESPÉCIE <i>Lactobacillus paracasei</i>	26
1.4 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	27
1.4.1 Critérios de seleção de microrganismos probióticos e legislação	28
1.4.2 Mecanismo de ação e benefícios atribuídos aos microrganismos probióticos	31
1.4.3 Aplicações e perspectivas para os microrganismos probióticos	33
1.5 IOGURTE	35
1.6 SEGURANÇA DE ALIMENTOS FERMENTADOS	37
1.6.1 Salmonella spp.	39
1.6.2 Escherichia coli	40
1.6.3 Listeria spp.	41
1.7 BIOPRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS: UMA NOVA ABORDAGEM	41
1.8 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS	43
1.9 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR QPCR EM ALIMENTOS	45
1.10 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO VIÁVEIS POR PMA-qPCR	48
1.11 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	53
1.11.1 Ensaio de Agar Spot	54
1.11.2 Ensaio de Difusão em Poço	54
REFERÊNCIAS	56
CAPÍTULO II	72
2. Quantification of <i>Lactobacillus paracasei</i> viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR	72
1. Introduction	75
2. Material and Methods	77
2.1 Bacterial strains and culture conditions	77
2.2 Probiotic yoghurt preparation	77
2.3 Heat treatment of <i>Lactobacillus paracasei</i> culture	78

PMA treatment	78
2.5 DNA extraction	78
2.6 Real-time PCR quantification	79
2.7 Construction of standard curves	79
2.8 <i>Lactobacillus paracasei</i> enumeration by qPCR and plate count	80
3. Results	81
3.1 TUF qPCR parameters for <i>Lactobacillus paracasei</i> quantification	81
3.2 PMA-treatment efficiency for viable cell quantification	82
3.3 <i>Lactobacillus paracasei</i> viable cell quantification by PMA-qPCR	83
4. Discussion	85
SUPPLEMENTARY DATA	89
REFERENCE	96
CAPÍTULO III	101
3. <i>Lactobacillus paracasei</i> as bio-control agent against foodborne pathogens in artisanal probiotic yoghurt	101
1. Introduction	103
2. Material and Methods	105
2.2 Bacterial strains and culture conditions	105
2.3 Survival and growth at low temperature and assessment of acid tolerance	106
2.3 In vitro assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains	107
2.3.1 Preparation of cell free supernatants	108
2.3.2 Agar well diffusion assay	108
2.3.3 Agar spot assay	108
2.4 Artisanal yoghurt preparation	109
2.5 Probiotic supplementation and pathogens' survival, present as post-contamination, during storage of yoghurt	109
2.6 pH measurements during yoghurt production and enumeration of pathogens and <i>Lactobacillus paracasei</i> during storage of yoghurt	110
2.7 Statistical analysis	110
3. Results	112
3.1 Survival and tolerance assessment	112
3.2 In vitro antimicrobial activity of lactic acid bacteria	117
3.3 Antimicrobial activity of <i>Lactobacillus paracasei</i> in artisanal yoghurt	121
4. Discussion	124

5. Conclusion	126
REFERENCES	127
CAPÍTULO IV	132
4. Development of specific primers for detection of <i>Lactobacillus paracasei</i> by qPCR	
1. Introduction	135
2. Material and Methods	137
2.1 Bacterial strains and culture conditions	137
2.2 Bacterial DNA extraction	137
2.3 DNA quantification	138
2.4 Primer design	139
2.5 qPCR reactions	139
3. Results and Discussion	140
3.1 Bacterial DNA extraction	140
3.2 Specificity of initiators for specific detection of <i>Lactobacillus paracasei</i>	141
4. Conclusion	146
REFERENCES	147
CONSIDERAÇÕES FINAIS	149
Anexo A: Artigo publicado	150
Anexo B: Certificado de apresentação oral na VI Semana Acadêmica de Ciência e Tecnologia de Alimentos	151
Anexo C: Certificado de premiação 1 ° lugar Apresentação Oral na VI Semana Acadêmica de Ciência e Tecnologia de Alimentos	152
Anexo D: Registro como estudante internacional de doutorado na Universidade de Ghent	153
Anexo E: Submissão do artigo científico	154

INTRODUÇÃO

Atualmente, os consumidores não estão interessados apenas no sabor dos alimentos, mas principalmente nos benefícios à saúde. Existe uma demanda crescente por alimentos que oferecem bem-estar e contribuem para o prolongamento de vida, como alimentos funcionais (ROBERTS et al., 2018).

O conceito de alimento funcional foi definido em 1984 por pesquisadores japoneses que investigaram correlações entre nutrição, qualidade sensorial e modulação de sistemas fisiológicos (SIRO et al., 2008). Segundo a Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os alimentos podem apresentar alegação de propriedade funcional ou alegação de propriedade de saúde. A primeira é relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano, enquanto a alegação de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. Os alimentos funcionais podem melhorar as condições do corpo, reduzir ou prevenir o risco de algumas doenças e conseqüentemente, melhorar o bem-estar do consumidor (TUFARELLI; LAUDADIO, 2016). Diferentes componentes funcionais têm sido adicionados às matrizes alimentares para fornecer esses benefícios, como os prebióticos, probióticos e simbióticos (DE VUYST; LEROY, 2007; ILHA et al., 2015).

Os alimentos probióticos são os principais responsáveis pelo crescimento do mercado de alimentos funcionais (GRANATO, DANIEL., 2010). Eles são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2015). As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais utilizadas como cepas probióticas (CAROLINA; BURITI; ISAY, 2007; CHIANG, S.; PAN, 2012; DAVIS, 2014; ILHA et al., 2015; VILLARREAL et al., 2013). Estudos têm demonstrado que alimentos probióticos podem ser eficazes na redução do nível sérico de colesterol, distúrbios intestinais, doenças inflamatórias e também melhoram a função gastrointestinal, o sistema imunológico e reduzem o risco de câncer de cólon (BASU et al., 2018).

A aplicação de cepas probióticas em lácteos é frequente, pois proporcionam um bom ambiente para o crescimento e proliferação das bactérias (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012). Alimentos como iogurte têm sido comumente usados como veículo para

a incorporação de cepas probióticas (DAVE E SHAH, 1997; KRISTO et al., 2003; VAN DE CASTEELE et al., 2006; SACCARO et al., 2009; HAN et al. al., 2014; ILHA et al., 2016; SCARIOT et al., 2017). Os métodos microbiológicos clássicos, também conhecidos como métodos dependentes de cultivo são utilizados para identificar e quantificar probióticos em matrizes alimentares. Entretanto, espécies de *Lactobacillus*, especialmente os membros pertencentes ao grupo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*) são frequentemente difíceis de identificar pelas técnicas clássicas, uma vez que apresentam necessidades nutricionais e de crescimento semelhantes (CAROLINA; BURITI; ISAY, 2007; KAO, Y.-T.; LIU, Y.-S.; SHYU, 2007).

As técnicas clássicas da microbiologia são técnicas que consomem quantidades elevadas de reagentes e materiais e demandam dias para conhecer o laudo final da análise, além de serem consideradas específicas necessitando muitas vezes de testes bioquímicos confirmatórios. Como alternativa aos inconvenientes encontrados na utilização das técnicas clássicas, os métodos conhecidos como independentes de cultivo têm sido propostos. Esses métodos são baseados em análises diretas de DNA ou RNA extraído da matriz alimentar (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, (2015). A Reação em Cadeia da Polimerase tem representado a técnica base dos métodos independentes de cultivo (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013). Apesar dos métodos independentes de cultivo terem resolvido os problemas de baixa sensibilidade e especificidade das técnicas clássicas, a incapacidade de diferenciar células viáveis e não viáveis tornou-se um grande inconveniente, uma vez que o DNA é capaz de persistir no ambiente mesmo após as células perderem a viabilidade (GARCÍA-CAYUELA et al., 2009; NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; TABASCO; PELA; REQUENA, 2009).

Uma maneira de discriminar DNA de células viáveis e não viáveis consiste no uso de agentes intercalantes de DNA, tais como monoazida de propídio (PMA) (NOCKER, CHEUNG et al., 2006). O uso de PMA em conjunto com a técnica qPCR tem sido proposto para a quantificação específica de células viáveis em comunidades microbianas (GANESAN et al., 2014; SUN et al., 2015).

Frequentemente, produtos fermentados como iogurte são considerados seguros. Eles têm pH baixo e essa característica não favorece o crescimento de muitos microrganismos patogênicos de origem alimentar (CUTRIM et al., 2016; KAMAL et al., 2018). Apesar disso, muitos autores mostraram a sobrevivência de algumas bactérias patogênicas em alimentos fermentados, especialmente iogurtes e outros produtos lácteos

(AHMED; SHIMAMOTO, 2014; AKKAYA et al., 2015; ANTUNOVIC et al., 2018; BACHROURI; QUINTO; MORA, 2006; KAMAL et al., 2018; MCINGVALE et al., 2000; SEYOUM et al., 2015). Ainda, em muitos países, esses produtos são feitos artesanalmente a partir de leite cru, sem tratamento térmico ou boas condições de higiene (KAMAL et al., 2018). Desta forma, é necessário encontrar estratégias eficientes para o controle de bactérias patogênicas de origem alimentar e evitar ou reduzir os surtos alimentares. Uma alternativa é o uso de agentes de biocontrole, isto é, o uso de culturas protetoras, como cepas probióticas. As espécies de *Lactobacillus* com propriedades probióticas e atividade antimicrobiana estão bem documentadas (INGLIN et al., 2018; KAMAL et al., 2018; VERMEIREN; DEVLIEGHIERE; DEBEVERE, 2004).

Desta forma, esta tese é apresentada em capítulos. O Capítulo I apresenta uma revisão de bibliografia destacando conceitos fundamentais sobre os microrganismos probióticos e sua atividade e contribuição na tecnologia de alimentos, bem como as principais técnicas utilizadas na identificação, quantificação e avaliação de suas propriedades. O Capítulo II apresenta o artigo publicado na revista *International Journal of Food Microbiology* (A1; FI 4,006) em 2018, intitulado “Quantificação de células viáveis de *L. paracasei* em iogurte probiótico por monoazida de propídio combinado com PCR quantitativa”, o qual teve como objetivo principal desenvolver um ensaio PMA-qPCR para quantificação de células viáveis de *L. paracasei* em amostras de iogurte probiótico. O Capítulo III apresenta um estudo desenvolvido durante o estágio de doutorado sanduíche no exterior, financiado pela CAPES, pelo período de 6 meses na Universidade de Ghent, Bélgica. O estudo tem como título “*Lactobacillus paracasei* como agente de biocontrole contra os principais microrganismos de origem alimentar em iogurte artesanal” e foi submetido para a revista *International Journal of Food Microbiology*. Nesse capítulo investigamos a sobrevivência e tolerância de bactérias ácido lácticas e microrganismos patogênicos sob condições ácidas e armazenamento a frio e correlacionamos com as características de biocontrole das bactérias ácido lácticas. Além disso, avaliamos a capacidade de usar a estirpe *L. paracasei* como probiótico e agente de biocontrole contra o crescimento de microrganismos patogênicos em amostras de iogurte artesanal. Por fim, o capítulo IV apresenta o desenvolvimento e síntese de iniciadores espécie-específicos para a detecção específica de *L. paracasei* utilizando PCR quantitativa.

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Revisão Bibliográfica

1.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de microrganismos que apresentam características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas comuns. Entretanto, não apresentam uma definição única; sendo, portanto, descritas amplamente como microrganismos gram-positivos, não esporulantes, quase sempre catalase negativa, anaeróbios, aerotolerantes, ácido tolerantes e com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto da fermentação de carboidratos (DE VUYST; LEROY, 2007; PFEILER; KLAENHAMMER, 2007).

As BAL encontram-se sob as formas de cocos ou bacilos e estão associadas a ambientes nutricionalmente ricos e complexos como vegetais, leite, carne e trato gastrointestinal humano e animal. A fonte de energia é proveniente de matérias orgânicas, em especial os carboidratos e por isso são denominados quimiorganotróficos. Classificam-se como mesófilos ou termófilos, apresentando temperatura ótima de crescimento variando de 30 a 37 °C e de 45 a 50 °C respectivamente (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FERREIRA, 2003).

As BAL são fermentadoras de carboidratos e de acordo com o produto final da fermentação são classificadas em: (a) homofermentativas, as quais catabolizam glicose sob limitada disponibilidade de oxigênio na via Embden-Meyerhof-Parnas, resultando em ácido láctico e (b) heterofermentativas, que utilizam a via das pentoses-fosfato para degradar o substrato liberando como produto final ácido láctico, ácido acético, etanol e gás carbônico (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010; PATEL; MAJUMDER; GOYAL, 2012).

Segundo Ferreira (2003), o grupo das BAL compreende 15 gêneros, entre eles: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella*.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* e *Lactobacillus plantarum* foram as primeiras BAL com os genomas sequenciados (BOLOTIN et al., 2001). Desde então, o número de genomas sequenciados de BAL tem crescido exponencialmente. Segundo Johnson; Klaenhammer (2014), até o ano de 2014 mais de 100 diferentes cepas de BAL tiveram seu genoma completo ou parcialmente disponíveis em bancos de dados.

O grupo das BAL é reconhecido como um dos mais importantes para o homem devido as funções que exercem tanto na produção e preservação de alimentos quanto nos aspectos da saúde humana e animal (FERREIRA, 2003).

As BAL são reconhecidas como microrganismos seguros e apresentam o GRAS – “geralmente reconhecido como seguro”, do inglês “*Generally Recognized as Safe*), uma designação proposta pela *Food and Drug Administration* (FDA) para substâncias químicas e substâncias adicionadas aos alimentos consideradas seguras por especialistas (PARADA et al., 2007). Os metabólitos produzidos por esses microrganismos têm sido consumidos por humanos através dos alimentos fermentados há milhares de anos e sem nenhum conhecimento de efeitos adversos (PARADA et al., 2007; SIDOOSKI et al., 2019).

No âmbito da saúde, muitas BAL são reconhecidas e utilizadas como microrganismos probióticos, os quais são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas e constantes conferem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2015). Os microrganismos probióticos apresentam a capacidade de modular o crescimento da microbiota intestinal, diminuindo as populações microbianas potencialmente prejudiciais e reforçando os mecanismos de defesa natural do organismo (O’MAY; MACFARLANE, 2005).

As BAL contribuem no desenvolvimento de sabor, aroma, textura e no valor nutricional dos alimentos, através da produção de compostos de aroma, proteínas e compostos nutricionais como as vitaminas (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998). Elas são ainda capazes de quebrar as moléculas de proteínas, gorduras e carboidratos presentes nos alimentos, contribuindo assim para a melhoria da absorção desses nutrientes (GEMECHU, 2015; SIDOOSKI et al., 2019).

Na produção e preservação de alimentos, as BAL estão relacionadas com alimentos de elevada ou média acidez, como leites fermentados, iogurtes, queijos, salames, presuntos, chucrutes, pepinos, carnes, cervejas, vinhos e fermentos para panificação (CORBO et al., 2014; MANI-LÓPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2014).

Além da produção de compostos que atuam diretamente nas características sensoriais dos alimentos fermentados, as BAL também desempenham papel na preservação e segurança microbiológica dos mesmos. A atividade antimicrobiana apresentada pelas BAL deve-se principalmente à produção de ácidos orgânicos, em especial ácido lático e ácido acético, dióxido de carbono, etanol, ácido fórmico, ácidos graxos, peróxido de hidrogênio e diacetil. Além disso, também pode produzir

bacteriocinas, que são peptídeos ou proteínas, os quais podem atuar como bactericida ou bacteriostático (DE VUYST; LEROY, 2007).

1.2 GÊNERO *Lactobacillus*

Taxonomicamente, o gênero *Lactobacillus* pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae* (LEBEER; VANDERLEYDEN; DE KEERSMAECKER, 2010) e é considerado o maior grupo entre as BAL, apresentando mais de 200 espécies e subespécies descritas (SUN et al., 2015).

Este grupo é considerado extremamente heterogêneo, visto que abrange espécies com uma ampla variedade de fenótipos e genótipos estritamente relacionados entre si (SAKAI et al., 2010). Com os avanços da biologia molecular, foi possível identificar diferenças genéticas entre os microrganismos e desta forma, inúmeras espécies sofreram redenominações ou alterações de gênero, sendo o gênero *Lactobacillus* um dos mais submetidos a desagregação, agregação e redenominação de espécies (WUYTS et al., 2017).

A primeira cepa de *Lactobacillus* foi descrita por Moro, em 1900, o qual a denominou de *Lactobacillus acidophilus*. Para essa denominação utilizaram-se poucos critérios e por isso, todos os bacilos gram-positivos, asporogênicos, isolados da boca, órgão reprodutor feminino e intestino passaram a ser denominados de *L. acidophilus*. Em 1970, Hansen e Mocquot descreveram a espécie com mais detalhes e novas propostas começaram a surgir (FERREIRA, 2003).

Dentre as inúmeras espécies do gênero *Lactobacillus*, as que compõe o grupo *L. casei* são as que mais sofrem ajustes de taxonomia por apresentarem comportamentos fisiológicos e necessidades nutricionais muito semelhantes entre si (FELIS et al., 2001). Desde a reunião da *Judicial Commission of the International Committee for Systematic of Prokaryotes* em 2005, o grupo *L. casei* compreende três diferentes espécies nomeadas como *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (CAROLINA; BURITI; ISAY, 2007). Essas três espécies foram discriminadas por RAPD-*finger printing*, pelo sequenciamento dos genes *tuf* e *cpn60* e por PCR espécie-específica, tendo como alvo o gene 16S rDNA e uma sequência intergênica entre os genes 16S e 23S (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013).

Na tecnologia de alimentos, as espécies do gênero *Lactobacillus* são frequentemente utilizadas na produção e preservação de alimentos devido à acidificação rápida e melhoria das características sensoriais, tais como sabor e textura (DE VUYST;

LEROY, 2007). Assim, são utilizadas como culturas *starter* ou complementares em queijos, iogurtes, vegetais fermentados, carnes fermentadas, produção de vinho e cerveja, massa azeda e silagem. A ação conservante ocorre através do decréscimo rápido de pH na matéria-prima crua, em consequência da produção de ácido láctico, o principal produto do metabolismo primário. A produção de bacteriocinas e compostos de aroma também são importantes para qualidade e valor nutricional do produto final, além de ajudar a expandir o espectro de utilidades tecnológicas do gênero (CAROLINA; BURITI; ISAY, 2007; DE VUYST; LEROY, 2007).

Além da importância na tecnologia de alimentos, os membros do gênero *Lactobacillus* tem contribuído significativamente na indústria química. Eles são capazes de produzir enantiômeros de ácido láctico, os quais são utilizados na produção de bioplásticos. Outros compostos são também produzidos por *Lactobacillus*, tais como 1,3-propanodiol, uma substância amplamente utilizada em cosméticos, adesivos e na indústria têxtil (REDDY et al., 2008).

1.3 ESPÉCIE *Lactobacillus paracasei*

Lactobacillus paracasei é uma bactéria Gram-positiva, possui forma de bastonetes, não apresenta motilidade e sua temperatura ótima de crescimento em meio de cultura varia entre 10 °C e 40 °C. Essa bactéria é responsável pela produção de L(+) ácido láctico a partir da amidalina, arbutina, celobiose, frutose, galactose, glicose, maltose, manitol e entre outros (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Devido ao potencial probiótico e a produção de antimicrobianos, além das inúmeras propriedades tecnológicas, *L. paracasei* tem sido frequentemente adicionado a diversas matrizes alimentares.

A descrição de *Lactobacillus paracasei*, segundo Klein, G.; Pack, A.; Bonaparte, C.; Reuter (1998) foi baseada em poucos estudos científicos, através da verificação da homologia DNA-DNA, complementado por uma pequena descrição de características fenotípicas das cepas. Entre as principais características fenotípicas estão a morfologia, modo de fermentação de glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico e fermentação de carboidratos. No entanto, as características fenotípicas apresentadas pelas BAL permitem distinguir somente a espécie *L. rhamnosus*, pois a mesma é capaz de fermentar ramnose, enquanto as outras espécies não são capazes.

Segundo Kao, Y.-T.; Liu, Y.-S.; Shyu, (2007), os membros do gênero *Lactobacillus*, em especial os membros do grupo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*) são difíceis de serem diferenciados por técnicas clássicas, por apresentarem características fenotípicas

como necessidades nutricionais e de crescimento extremamente semelhantes. Desta forma, técnicas analíticas rápidas e precisas como as técnicas moleculares são importantes para a identificação, o monitoramento e a quantificação desses microrganismos, principalmente quando os mesmos estão inseridos em alimentos, tais como os probióticos.

A capacidade das cepas de *Lactobacillus paracasei* de atuarem como probióticos foi evidenciada em diversos estudos. Valerio et al. (2006), demonstraram a capacidade de cepas com potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei* de sobreviverem em alcachofras por no mínimo 90 dias. Patrignani et al. (2006), investigaram as características tecnológicas e funcionais de BAL isoladas utilizadas na produção de um leite fermentado tradicional da região de Maasai (Kenya). Os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios e permitiram a seleção de cepas potencialmente probióticas dotadas de propriedades tecnológicas. Entre tais propriedades, destaca-se a alta viabilidade durante o armazenamento refrigerado, após a acidificação rápida com cepas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*.

Chiang, S. S. e Pan (2012) demonstraram a ação probiótica de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* cepa 101 NTU isolada de fezes de recém-nascidos e seus produtos fermentados. A cepa mostrou-se capaz de sobreviver em pH baixo, tolerar altas concentrações de bile e ser eficaz no tratamento contra hipertensão e hipercolesterolemia.

1.4 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

O termo probiótico tem origem grega e significa “para a vida”. Foi introduzido pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell e era definido como o fator de origem microbiológica responsável por estimular o crescimento de outros organismos (DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, 2008). Mais tarde, Fuller (1989), definiu probiótico como um “suplemento microbiano vivo que beneficia a saúde do animal hospedeiro mantendo ou melhorando o balanço da microbiota intestinal”, dando ênfase para a importância de células viáveis como componente principal de um probiótico eficiente.

Em 1991, Huis in't Veld e Havenaar propuseram que probiótico seria uma única ou mistura de culturas bacterianas vivas, que poderiam ser empregadas em homens e animais, de forma desidratada ou em produtos fermentados (ANUKAM, K. C.; REID, 2007).

Em 1907 a presença dos microrganismos probióticos já tinha sido evidenciada, pelo cientista e professor do Instituto Pasteur, Elie Metchnikoff. O cientista postulou que

as bactérias ácido lácticas ofereciam benefícios à saúde humana e que promoviam longevidade, ao sugerir que muitas doenças eram causadas pelo efeito de toxinas e metabólitos produzidos por microrganismos ingeridos (ANUKAM, K. C.; REID, 2007). Propôs ainda que a intoxicação intestinal e o envelhecimento poderiam ser suprimidos modificando a microbiota intestinal e utilizando microrganismos benéficos para substituir os proteolíticos como *Clostridium*, os quais são produtores de substâncias tóxicas oriundas da digestão de proteínas (PERES, C. M.; PERES, C.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, 2012).

Diante da demonstração científica de Metchnikoff acerca dos benefícios causados por BAL, Henry Tissier, um pediatra francês, observou que crianças com diarreia tinham em suas fezes um baixo número de bactérias caracterizadas por uma morfologia em forma de “Y”. No entanto, essas mesmas bactérias eram abundantes em crianças saudáveis. Assim, ele sugeriu que esses microrganismos fossem administrados em pacientes que demonstrassem tal sintoma para auxiliar a restaurar a microbiota intestinal saudável (ANUKAM, K. C.; REID, 2007).

Atualmente, probióticos são “definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2015). A indústria de alimentos probióticos tem sido considerada o futuro no mercado de alimentos funcionais. Dados econômicos estimam um aumento de 3,3 para 7 bilhões de dólares no mercado global de suplementos alimentares probióticos de 2015 a 2025 (Statista, 2019). Além disso, os consumidores estão se tornando mais conscientes e têm buscado alimentos que além da função de nutrir, agreguem benefícios à saúde, orientando desta forma a indústria de alimentos a enfatizar a promoção de alimentos funcionais (KHEDKAR; CARRARESI; BRÖRING, 2017).

1.4.1 Critérios de seleção de microrganismos probióticos e legislação

Inúmeras cepas de bactérias e leveduras têm sido caracterizadas como potencialmente probióticas, no entanto, os membros pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* constituem os principais representantes. Ambos os gêneros são GRAS (“geralmente reconhecidos como seguros”) e também habitantes dominantes na microbiota do intestino humano (VLASOVA et al., 2016).

Além disso, a Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (EFSA) concedeu um status para algumas espécies de *Lactobacillus*, baseado em seus critérios de

segurança (identidade, possível patogenicidade, uso final), denominado Presunção de Segurança Qualificada – do inglês, “*Qualified Presumption of Safety*” (QPS) (RICCI et al., 2017).

Até o momento, 36 espécies de *Lactobacillus* receberam o status de QPS e entre elas incluem: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. amylolyticus*, *L. amylovorus*, *L. animalis*, *L. alimentarius*, *L. aviários*, *L. brevis*.

Para que um microrganismo seja considerado probiótico, de acordo com sugestões da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Autoridade Europeia para Segurança de Alimentos (EFSA), é necessário que o mesmo atenda a uma série de critérios de segurança e funcionalidade, bem como, critérios relacionados às suas propriedades tecnológicas (PAULINA MARKOWIAK; KATARZYNA SLIZEWSKA, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios de seleção e propriedades desejadas para os microrganismos probióticos.

Critério de Seleção	Propriedade Desejada
Segurança	<ul style="list-style-type: none"> • Origem humana e/ou animal; • Isolado do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis; • Histórico de uso seguro; • Identificação precisa; • Ausência de dados associados às doenças infecciosas; • Ausência de genes responsáveis por resistência à antibióticos.
Funcionalidade	<ul style="list-style-type: none"> • Competitividade em relação à microbiota habitante do trato gastrointestinal; • Capacidade de sobreviver e manter a atividade metabólica no trato gastrointestinal; • Resistência aos sais biliares e enzimas; • Resistência ao pH ácido do estômago; • Atividade antimicrobiana contra patógenos; • Resistência a bacteriocinas e ácidos produzidos pela microbiota intestinal endógena; • Capacidade de adesão e colonização de sítios específicos no organismo hospedeiro.

Propriedade tecnológicas	<ul style="list-style-type: none">• Alta produtividade de culturas;• Fácil produção;• Estabilidade das propriedades desejadas durante os processos de produção;• Alta taxa de sobrevivência no armazenamento dos produtos finais;• Garantia das características sensoriais desejadas no produto final;• Estabilidade genética;• Resistência a bacteriófagos.
--------------------------	--

Fonte: Adaptado de Paulina Markowiak; Katarzyna Slizewska (2017).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta as diretrizes acerca dos microrganismos e alimentos probióticos. A Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Enquanto a Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018, dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares e a Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.

Para que um microrganismo seja reconhecido como probiótico, segundo a legislação brasileira, é necessária a preparação de um dossiê técnico-científico, que reúne informações essenciais para o processo de avaliação, incluindo: linhagem do microrganismo, benefícios alegados, população alvo, tipos de alimentos indicados para sistema de entrega do microrganismo, quantidade mínima sugerida para obtenção do benefício à saúde alegado e condições de uso. A identificação correta do microrganismo é o primeiro passo. É necessário identificar a espécie de acordo com a nomenclatura binomial mais atual, caracterizar através de metodologias específicas as características fenotípicas e genotípicas, especificar a origem da linhagem e comprovar o depósito da linhagem em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida (BRASIL, 2008).

Com relação à segurança dos microrganismos probióticos, a legislação dita que é necessário evidenciar: histórico de uso seguro do mesmo, ausência de registros adversos evidenciados através de estudos clínicos, ausência de fatores de virulência e

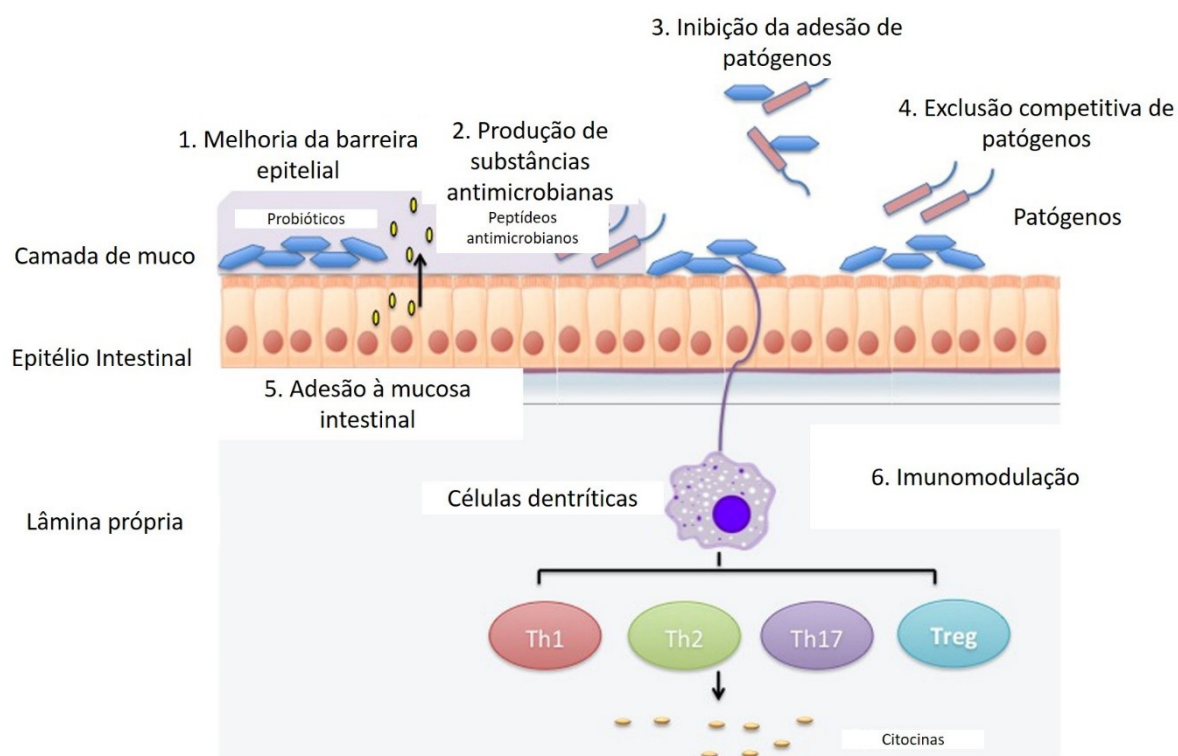
patogenicidade, ausência de produção de substâncias nocivas à saúde e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (BRASIL, 2018).

Para que um alimento seja considerado probiótico é necessário que apresente uma contagem de no mínimo 10^6 - 10^7 UFC/g de produto (HILL et al., 2015). No Brasil, a legislação recomenda 10^8 - 10^9 UFC/porção diária do produto pronto para consumo. Além disso, é necessário um laudo de análise que comprove a contagem mínima viável do microrganismo até o fim do prazo de validade (BRASIL, 2008).

1.4.2 Mecanismos de ação e benefícios atribuídos aos microrganismos probióticos

Os mecanismos de ação dos microrganismos probióticos para exercer seus efeitos benéficos à saúde do hospedeiro ainda não estão completamente elucidados. Diversos estudos propõem uma série de mecanismos, dentre os quais destacam-se: exclusão competitiva por sítios de adesão e fontes nutricionais, produção de substâncias antimicrobianas, melhoria na função da barreira intestinal e imunomodulação (Figura 1) (DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, 2008; WAN; FORSYTHE; EL-NEZAMI, 2019).

Figura 1: Mecanismos de ação dos microrganismos probióticos.



Fonte: Adaptado de WAN; FORSYTHE; EL-NEZAMI (2019).

A exclusão competitiva é um dos mecanismos de ação mais estudados. Acredita-se que a exclusão é baseada na interação bactéria-bactéria, influenciada pela competição dos nutrientes e sítios de adesão. Probióticos podem inibir o crescimento de patógenos através da interação entre proteínas de superfície e mucinas (glicoproteínas, agentes protetores de mucosas) (SERVIN, 2004). Além disso, são capazes de transformar o ambiente a fim de torná-lo menos favorável para os competidores, através por exemplo da produção de antimicrobianos (SCHIFFRIN; BLUM, 2002; WAN; FORSYTHE; EL-NEZAMI, 2019).

Em segundo lugar está a produção de substâncias antimicrobianas. Entre elas, destacam-se peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas. Essas substâncias atuam diretamente nas células bacterianas e/ou no metabolismo, impedindo o crescimento de patógenos e conseqüentemente, trazendo benefícios à saúde do hospedeiro.

Infecções por microrganismos patógenos, doenças inflamatórias intestinais e outras desordens intestinais podem se desenvolver quando a barreira epitelial não está atuando de forma correta. É conhecido que os microrganismos probióticos são capazes de colaborar na manutenção dessa barreira, melhorando as funções fisiológicas. A maneira pela qual os probióticos são capazes de influenciar na barreira de proteção epitelial ainda não é inteiramente conhecida. Alguns estudos mostram que há um aumento da expressão gênica envolvida na sinalização de junções estreitas. Por exemplo, os *Lactobacillus* modulam a regulação de genes que codificam, em particular, proteínas de junção de aderência, tais como E-caderina e β -catenina. Além disso, a incubação com *Lactobacillus* influencia diferencialmente a fosforilação das proteínas de adesão e a abundância de isoformas da proteína quinase C (PKC), como a PKC δ , que modula positivamente a função da barreira epitelial (HUMMEL et al., 2012).

Outros estudos mostram a capacidade do probiótico em induzir ou super expressar no hospedeiro a mucina, glicoproteínas que são os principais componentes da camada de muco epitelial que recobre o epitélio intestinal e estão intimamente implicadas na saúde. A mucina forma uma barreira físico-química que protege as células epiteliais de danos químicos, enzimáticos, mecânicos e microbianos e limita a aderência microbiana e a subsequente invasão (MACK et al., 2003). Os probióticos podem aumentar a produção de mucina como um dos mecanismos para melhorar a função da barreira intestinal e, posteriormente, os efeitos anti-adesivos de bactérias patógenos por exclusão ou deslocamento competitivo (COLLADO; ISOLAURI; SALMINEN, 2008). Foi

demonstrado que várias espécies de *Lactobacillus* aumentam a expressão de mucina nas linhas celulares intestinais humanas (MATTAR et al., 2002).

Outro mecanismo proposto de ação dos probióticos é a imunomodulação no ambiente gastrointestinal. A estimulação imunológica induzida por probióticos também se manifesta pelo aumento da produção de imunoglobulinas, aumento da atividade de macrófagos e linfócitos e estimulação da produção de interferon γ . Os componentes da parede celular de bactérias ácido lácticas são capazes de estimular a atividade dos macrófagos, os quais por sua vez, destroem os microrganismos através da produção de radicais livres de oxigênio e enzimas lisossômicas (PAULINA MARKOWIAK; KATARZYNA SLIZEWSKA, 2017).

Os principais efeitos benéficos à saúde atribuídos aos microrganismos probióticos são a modulação da resposta imunológica, com conseqüente melhora no quadro de constipação, redução, prevenção e tratamento de diversas doenças diarreicas; diminuição dos sintomas de intolerância à lactose; efeito hipocolesterolêmico e efeito anti-mutagênico (DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, 2008; RAVULA; SHAH, 2008). Além disso, alguns microrganismos probióticos são produtores naturais de vitaminas do grupo B (B1, B2, B3, B6, B8, B9 e B12).

Segundo a FAO e a OMS há a necessidade de que as cepas probióticas permaneçam intactas no trato intestinal superior para garantir os efeitos de promoção da saúde ao entrar no local de ação, independentemente do modo de entrega aplicado. Para isso, foi afirmado que o nível terapêutico mínimo de microrganismos probióticos viáveis deve ser de pelo menos 10^6 UFC / g de células viáveis durante o prazo de validade do produto (RAVULA; SHAH, 2008). Os efeitos produzidos por probióticos tem duração limitada, por isso, é recomendada a ingestão contínua de tais produtos (HILL et al., 2015).

1.4.3 Aplicações e perspectivas para os microrganismos probióticos

Os microrganismos probióticos devem atender à uma série de requisitos e aqueles relacionados à tecnologia de sua produção são de extrema importância, visto que os microrganismos precisam sobreviver e manter suas propriedades durante os processos de armazenamento e distribuição (LEE et al., 2009).

Inúmeros sistemas de entrega de microrganismos probióticos ao organismo humano têm sido estudados. As formulações farmacêuticas, sejam cápsulas, líquidos ou

comprimidos são consideradas mais eficientes do que as preparações à base de alimentos, entretanto, quando analisado o perfil de escolha do consumidor, nem sempre os produtos farmacêuticos são preferidos (KHEDKAR; CARRARESI; BRÖRING, 2017).

As preparações a base de alimentos representam um grande número de alimentos carreadores de microrganismos probióticos. As primeiras matrizes alimentares utilizadas foram à base de lácteos, como queijos, iogurtes, sorvetes, leites e cremes acidificados. Entretanto, atualmente há uma busca por alimentos não lácteos que possam também ser carreadores de probióticos, uma vez que há um grande número de alérgicos ou intolerantes à produtos lácteos e ainda aqueles que não aprovam as características sensoriais de tais produtos. Assim, as matrizes não lácteas encontradas tem sido sucos de frutas, carnes e chocolates (MANTZOURANI et al., 2018; REDDY; MIN; WEE, 2015; TRABELSI et al., 2019).

Seja qual for o sistema de entrega do microrganismo probiótico é necessário avaliar as propriedades físico-químicas de cada matriz, uma vez que diversos fatores podem afetar além das características sensoriais, a viabilidade celular e a liberação efetiva dos probióticos no trato gastrointestinal (TERPOU et al., 2019).

A viabilidade bacteriana refere-se à capacidade de uma célula crescer e gerar uma colônia de células sob condições ambientais definidas (WILKINSON, 2018). Tal característica é considerada um desafio tecnológico, uma vez que a funcionalidade dos probióticos é dependente da viabilidade bacteriana. Galdeano e Perdigon (2004) realizaram um estudo em camundongos sobre o efeito de *Lactobacillus* viáveis e não viáveis e sua persistência na estimulação imune intestinal e mucosa. Os autores demonstraram que a viabilidade das bactérias era necessária para estimular o sistema imunológico do intestino. Por outro lado, estudos demonstraram que a viabilidade não é obrigatória para todos os efeitos probióticos, pois nem todos os mecanismos celulares estão diretamente relacionados à viabilidade, uma vez que mesmo as células mortas provaram fornecer efeitos benéficos ao consumidor (DARGAHI et al., 2019).

Inúmeros fatores podem influenciar a viabilidade de probióticos em alimentos durante o processamento, armazenamento, distribuição e vida de prateleira. Esses fatores incluem parâmetros intrínsecos aos produtos como pH, acidez, nível de oxigênio, atividade de água, concentrações de sal, açúcar e outros compostos como aromatizantes e corantes artificiais. Além disso, os parâmetros de processamento incluindo as condições de fermentação (temperatura de incubação, tratamento térmico, condições de resfriamento e armazenamento do produto, materiais de embalagem, escala de produção)

e parâmetros microbiológicos (linhagem de probióticos empregados, taxa e proporção de inoculação) também podem interferir na viabilidade dos probióticos (GRATTEPANCHE; LACROIX, 2013).

O crescimento exponencial dos alimentos probióticos desencadeou uma série de desafios a serem vencidos. Pesquisas acerca das tecnologias apropriadas para a produção de probióticos, bem como a seleção de cepas bacterianas e a sobrevivência das mesmas sob diversas condições de processamento ainda são necessárias. O encapsulamento de bactérias probióticas tem se apresentado como uma abordagem eficiente para aplicação em diferentes matrizes alimentares. Entretanto, abordagens como essa acarretam em custos extras à indústria de alimentos, o qual muitas vezes pode não estar dentro dos limites aceitáveis para permanecer competitivo no mercado de alimentos funcionais (TERPOU et al., 2019).

Estudos como metabolômica, transcriptômica e proteômica podem elucidar o entendimento das interações entre as vias metabólicas da microbiota intestinal e o hospedeiro, aliando com as características como idade, sexo, estilo de vida e dieta. Além disso, atualmente os consumidores estão buscando por tecnologias consideradas “verdes”, isto é, tecnologias de produção que sejam sustentáveis e com a menor produção de resíduos. Desta forma, a tendência nos estudos com probióticos deve-se concentrar na produção de alimentos probióticos seguros e ecológicos (TERPOU et al., 2019).

1.5 IOGURTE

Durante a década de 1960, com o objetivo de aumentar a aceitação popular de iogurtes houve a adição de frutas ao produto. Além disso, as indústrias investiram em maior divulgação das propriedades nutritivas e terapêuticas dos iogurtes, resultando assim em um aumento no consumo (TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K.; LATRILLE, 2001).

A Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA) tem como objetivo estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverão atender os leites fermentados destinados ao consumo humano. Assim, entende-se por leites fermentados os produtos obtidos por coagulação ou diminuição do pH e por fermentação láctea mediante ação de cultivos de microrganismos (ativos, viáveis e abundantes) específicos, adicionados ou não de outras substâncias alimentícias. Desta forma, é estabelecido que iogurte é o produto incluído na definição anteriormente citada, cuja fermentação realiza-se com cultivos

protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, onde pode haver acompanhamento de forma complementar de outras BAL, que por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

Dados econômicos mostram que até 2020 é esperado que o mercado de iogurtes atinja um crescimento de 8%, totalizando aproximadamente US\$ 13 bilhões. Brasil, Rússia e Índia estão entre os países que apresentam melhor e maior expansão no mercado de iogurtes (DAIRY REPORTER, 2016).

Em escala industrial, a fabricação de iogurte envolve a suplementação do leite com ingredientes lácteos, com o objetivo de aumentar o teor de proteínas. Assim, o leite segue para um pré-aquecimento em trocador de calor, com o objetivo de transformar a gordura para estado líquido e segue para homogeneização para diminuição do tamanho dos glóbulos de gordura. Depois é encaminhado novamente aos trocadores de calor, onde acontece a pasteurização para garantir a qualidade microbiológica do produto e desnaturar as proteínas. Em seguida, a mistura é resfriada até a temperatura de fermentação e encaminhada aos tanques para dar início ao processo fermentativo. Nesse momento as culturas iniciadoras são adicionadas à formulação. Após a fermentação, o coágulo formado é quebrado, a mistura é resfriada, podendo haver a adição de aromas e/ou frutas e finalmente segue para o envase e refrigeração (TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K.; LATRILLE, 2001).

O uso de culturas iniciadoras tem o objetivo de melhorar o processo de fermentação de leites fermentados. Eles são responsáveis por um processo simbiótico, onde uma bactéria estimula o crescimento da outra. *Streptococcus thermophilus* multiplica-se rapidamente produzindo dióxido de carbono e ácido fórmico. Assim, estimula a multiplicação de *Lactobacillus bulgaricus* através da redução de pH, o qual por sua vez, produz peptídeos e aminoácidos necessários para a multiplicação de *Streptococcus thermophilus*. Em um período de aproximadamente 3 horas em processo fermentativo é possível observar uma proporção extremamente semelhante de ambos os microrganismos (SERAFEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; LASKARIDIS; SAGREDOS, 2012). O ácido láctico produzido durante esse processo é o principal responsável pela coagulação do leite através da redução do pH até o ponto isoelétrico da caseína (pH 4,65) (DOS REIS, D. L.; COUTO, E. P.; RIBEIRO, J. L.; NERO, L. A.; DE AGUIAR FERREIRA, 2014).

Os microrganismos utilizados como culturas iniciadoras no preparo de iogurtes não são reconhecidos como microrganismos probióticos uma vez que não são de origem entérica e não são capazes de aderir e colonizar o trato gastrointestinal humano (BRASIL, 2008).

Os iogurtes estão entre os alimentos mais utilizados como carreadores de microrganismos probióticos no mundo. De acordo com a pesquisa realizada por Food Processing (2014), o nível de conscientização dos consumidores de diferentes tipos de alimentos probióticos tem aumentado significativamente, como resultado principalmente da publicidade. Além disso, os iogurtes já são correlacionados com alimentos que trazem benefícios à saúde e suas características sensoriais têm sido de maior aceitabilidade pelos consumidores com a inclusão de frutas e outros sabores.

1.6 SEGURANÇA DE ALIMENTOS FERMENTADOS

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) ainda são uma importante questão de saúde no mundo. São definidas como síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, acompanhada ou não de febre, relacionada à ingestão de alimentos ou água contaminados. Além de sintomas digestivos, é possível a ocorrência de alterações extra intestinais em diferentes órgãos como rins, fígado e sistema nervoso central (BRASIL, 2010).

Dados da OMS (2019) estimam que 600 milhões de pessoas – cerca de 1 em cada 10 pessoas no mundo – adoecem após a ingestão de alimentos contaminados e desses, 420.000 morrem por ano sendo aproximadamente 125.000 casos atribuídos às crianças menores de 5 anos.

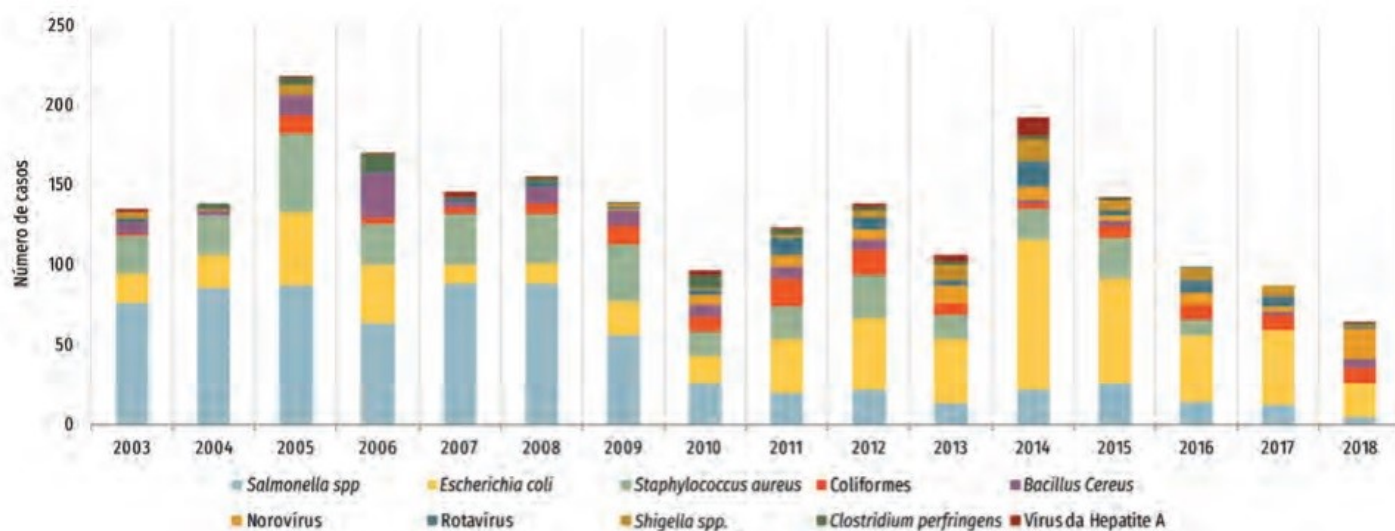
As doenças transmitidas por alimentos causam um enorme impacto na sociedade, impedindo o desenvolvimento socioeconômico, sobrecarregando os sistemas de saúde público e prejudicando a economia local, como turismo e comércio. Estimativas recentes mostram que o impacto de alimentos contaminados na economia representa cerca de US\$ 95 bilhões em perda de produtividade por ano (OMS, 2019).

Os sintomas após a ingestão de alimentos contaminados nem sempre são os mesmos em todos os indivíduos, entretanto, há grupos considerados sensíveis: crianças menores de 5 anos, idosos com 65 anos ou mais, mulheres gestantes e indivíduos com sistema imunológico enfraquecido (GKOGKA et al., 2013).

As DTA são causadas por bactérias, vírus, parasitas, substâncias químicas ou metais pesados. Aproximadamente 90% das DTA adquiridas nos Estados Unidos são atribuídos a sete patógenos: *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, Norovírus e *Toxoplasma gondii* (SCALLAN et al., 2015).

No Brasil, as DTA estão associadas frequentemente com *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Entre 2003 e 2018 foram notificados 10.898 surtos de DTA em todo território brasileiro, sendo as regiões Sudeste e Sul responsáveis por 39% e 29,7% dos surtos, respectivamente (BRASIL, 2010). A Figura 2 demonstra a distribuição dos principais agentes etiológicos identificados no Brasil nos últimos anos.

Figura 2: Distribuição dos 10 principais agentes etiológicos identificados em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre os anos 2003 a 2018.



Fonte: Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)/MS.

Data de atualização dos dados: 19/05/2019.

*Dados sujeitos a atualização.

Fonte: (BRASIL, 2010).

Alimentos fermentados sempre foram considerados microbiologicamente seguros em decorrência principalmente da acidificação, uma vez que o baixo pH não favorece o crescimento de microrganismos patogênicos (CUTRIM et al., 2016; KAMAL et al., 2018). Entretanto, inúmeros estudos têm mostrado casos da presença e desenvolvimento de microrganismos patogênicos em alimentos fermentados, os quais podem representar um grande risco à saúde humana (AHMED; SHIMAMOTO, 2014; BACHROURI; QUINTO; MORA, 2006; MCINGVALE et al., 2000; NIKODINOSKA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018; RIVERA-REYES; CAMPBELL; CUTTER, 2019).

Os principais patógenos associados a produtos fermentados tem sido *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. e *Campylobacter* (CAPOZZI et al., 2017).

McIngvale et al., (2000) observaram que houve crescimento de patógenos após 40 dias de armazenamento em amostras de iogurte refrigeradas. Além disso, *E. coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* foram capazes de sobreviver à condições ácidas em amostras de iogurte por mais de 21 dias sob armazenamento a frio (BACHROURI; QUINTO; MORA, 2006).

A produção de alimentos fermentados em escala familiar tem suas raízes em diversos países do mundo, especialmente os alimentos fermentados lácteos. Em muitos casos, leite cru é utilizado na produção. A ausência de processos térmicos padronizados para a matéria-prima pode representar um perigo à proliferação de patógenos (KAMAL et al., 2018). Além disso, a presença de microrganismos patógenos pode representar tanto um alto risco à saúde dos consumidores quanto um obstáculo para a venda e exportação dos alimentos com consequente dano econômico (GILLESPIE et al., 2006; KAMAL et al., 2018).

1.6.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é caracterizado por bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não apresentam formação de esporos e apresentam temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37 °C. Eles são geralmente móveis, em forma de bastão e capazes de fermentar glicose com produção de gás e ácidos. São amplamente distribuídos na natureza, sendo os humanos e animais os principais reservatórios. De acordo com o esquema Kauffmann-White-LeMinor, que se baseia na reativação imunológica com dois antígenos de superfície (antígenos flagelares (H) e somáticos (O)), existem mais de 2.600 sorotipos conhecidos de *Salmonella*. A maioria dos sorotipos pertence à *S. enterica*, os quais estão associados principalmente a vertebrados de sangue quente (STEVENS; HUMPHREY; MASKELL, 2009).

A Salmonelose, doença causada pela infecção por *Salmonella* spp., é uma das principais doenças transmitidas por alimentos no mundo. A dose infectante pode variar de 10^5 a 10^8 UFC para adultos sadios, enquanto 10^3 UFC é suficiente para que os sintomas

sejam apresentados em adultos imunocomprometidos. É caracterizada por febre, cólicas estomacais e diarreia. Os alimentos de origem animal, como ovos, carne, aves e produtos à base de carne representam os principais veículos da transmissão de *Salmonella* em humanos. Os sintomas desenvolvem-se entre 8 horas até 3 dias após a ingestão do patógeno e duram cerca de 4 a 7 dias (BOLLAERTS et al., 2008).

1.6.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa e frequentemente é encontrada no trato intestinal inferior de humanos e animais saudáveis. Em maior parte, são reconhecidas como inofensivas e ditas como indicadores de contaminação fecal e de más condições de higiene. Apesar disso, algumas *E. coli* adquiriram fatores de virulência que lhes permitiram adaptar-se a novos nichos e assim, adquiriram um caráter patógeno causando graves doenças (FARROKH et al., 2013).

Existem seis categorias de *E. coli* patógenos que afetam o intestino humano: *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) das quais *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) é um subgrupo patogênico; *E. coli* entero-patogênica (EPEC); *E. coli* entero-toxigênica (ETEC); *E. coli* entero-agregativa (EAEC); *E. coli* enterro-invasiva (EIEC); e *E. coli* difusamente aderente (DAEC).

E. coli O157: H7 é o sorotipo mais comum associado a surtos de diarreia com sangue e SHU (síndrome hemolítico-urêmica). As STECs são assim chamadas porque produzem uma ou mais citotoxinas, chamadas toxina Shiga 1 (stx1) e toxina Shiga 2 (stx2). A STEC tem uma dose infecciosa baixa, por isso os valores-guia microbianos se esforçam para a ausência em 25g (FASFC, 2017). As vias de transmissão para a infecção humana incluem fecal-oral, por alimentos, ambiental e pessoa a pessoa (CAPRIOLI et al., 2005). Os sintomas associados à infecção por STEC em humanos variam de acordo com a cepa de *E. coli* encontrada e a resistência do indivíduo a essa doença. Os casos geralmente apresentam cólicas abdominais, vômitos e/ou diarreia, que podem progredir para colite hemorrágica. As infecções por STEC podem resultar em SHU (Síndrome Hemolítico-Urêmica), caracterizada por insuficiência renal aguda, anemia e diminuição da contagem de plaquetas (GOULD et al., 2009).

A maioria das *E. coli* multiplicam-se entre 10 e 46° C, com algumas cepas crescendo a 8 ° C. Vidovic; Mangalappalli-illathu; Korber, (2011) mostraram que essas bactérias apresentam mecanismos genéticos inerentes que permitem melhor crescimento sob baixas temperaturas. As cepas de STEC ainda mostram resistência a ácidos, que é mediada principalmente pelo mecanismo RpoS, o qual contribui para que a cepa sobreviva à acidez do estômago e colonize o trato gastrointestinal. Além disso, também aumenta a sobrevivência das STEC em alimentos ácidos, permitindo a sobrevivência por longos períodos sob temperatura de refrigeração (FARROKH et al., 2013; VIDOVIC; MANGALAPPALLI-ILLATHU; KORBER, 2011).

1.6.3 *Listeria spp.*

O gênero *Listeria spp.* inclui seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*. *Listeria monocytogenes* é a única espécie de *Listeria* que é patogênica para os seres humanos e é o agente causador da listeriose (MCLAUHLIN et al., 2004). *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, não formadora de esporos, apresenta forma de bastonete e é anaeróbica facultativa. É amplamente distribuída na natureza e nos ambientes de processamento de alimentos. Foi isolada do solo, vegetação, esgoto, água, ração animal, carne fresca e congelada, resíduos de matadouros e nas fezes de animais saudáveis, incluindo humanos (MCLAUHLIN et al., 2004). Embora tenha uma faixa de temperatura ideal de 30 a 37 ° C, é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura entre 1 e 45 ° C. É considerada um microrganismo psicotrófico, o qual pode sobreviver e crescer sob temperaturas de refrigeração (0,4 - 45 ° C). São particularmente resistentes ao estresse ambiental e são capazes de sobreviver ou multiplicar sob condições desfavoráveis, tais como baixo pH (4,6-9,4, ótimo 7,0) e atividade de água (mínimo 0,92) (MCLAUHLIN et al., 2004).

A infecção por *L. monocytogenes* pode resultar em dois tipos de doenças humanas: a listeriose não invasiva, a qual afeta o sistema digestivo, resultando em sintomas que incluem febre, dores musculares e, às vezes, sintomas gastrointestinais (náuseas ou diarreia) e a listeriose invasiva mais grave que está associada a infecção do sistema nervoso central, sepse e bacteremia (GOULET et al., 2012; MCLAUHLIN et al., 2004).

1.7 BIOPRESERVAÇÃO DE ALIMENTOS: UMA NOVA ABORDAGEM

A fermentação é conhecida como um processo natural biológico o qual prepara e preserva alimentos crus prolongando sua vida de prateleira e melhorando as características sensoriais como sabor e textura (OLIVEIRA et al., 2018). Esse processo é baseado na acidificação do alimento cru. Frequentemente produtos fermentados tais como iogurtes são considerados seguros. Eles apresentam baixo pH e essa característica não favorece o crescimento de muitos microrganismos patógenos de origem alimentar (CUTRIM et al., 2016; KAMAL et al., 2018).

Apesar disso, muitos estudos tem reportado a sobrevivência de microrganismos patógenos em diversas matrizes alimentares, especialmente produtos lácteos fermentados (AHMED; SHIMAMOTO, 2014; BACHROURI; QUINTO; MORA, 2006; KAMAL et al., 2018; MCINGVALE et al., 2000; NIKODINOSKA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018; RIVERA-REYES; CAMPBELL; CUTTER, 2019).

Ahmed; Shimamoto (2014) investigaram a prevalência de patógenos de origem alimentar em carnes e lácteos coletados de vendedores ambulantes, açougues, mercados de varejo e matadouros no Egito. Os autores observaram alta incidência de *Salmonella* spp. em produtos à base de carnes enquanto em lácteos foi observado maior presença de cepas de *E. coli* O157:H7.

E. coli O157:H7, *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* foram capazes de sobreviver a condições ácidas em amostras de iogurte por mais de 21 dias de armazenamento a frio (BACHROURI; QUINTO; MORA, 2006). Outros estudos mostraram que esses patógenos foram capazes de serem cultivados a partir do dia 40 de armazenamento em amostras de iogurte (MCINGVALE et al., 2000).

A presença de microrganismos patógenos em alimentos representa um sério risco à saúde humana, além de ser um obstáculo para a venda e exportação dos mesmos gerando um alto risco econômico tanto para a indústria quanto para a sociedade (GILLESPIE et al., 2006). A produção de alimentos utilizando matéria-prima crua tem suas raízes em diversos países. Assim, a produção em escala familiar, a tradicionalidade de produtos frescos e regionais e a ausência de processamentos térmicos padronizados colocam em risco a segurança microbiológica dos alimentos (KAMAL et al., 2018).

Além disso, é notável a crescente demanda por alimentos prontos para o consumo e que apresentam o mínimo possível de conservantes e outras substâncias, isto é, o consumidor está cada dia mais interessado e preocupado com a composição dos

alimentos. Assim, é necessário que a segurança microbiológica dos alimentos seja proporcional à essa tendência (NIKODINOSKA et al., 2019).

Nesse sentido, a busca por medidas preventivas que minimizem o risco de contaminação e previnam o crescimento de microrganismos patogênicos de origem alimentar, se ocasionalmente presentes, tem sido imprescindível. Entre as principais estratégias, o uso de agentes de biocontrole e/ou seus compostos extracelulares tem sido considerados (JESUS et al., 2016; KAMAL et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; VERMEIREN; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2004). Esse processo é conhecido como biopreservação, onde o efeito bactericida de microrganismos específicos ou substâncias antimicrobianas são capazes de inibir o crescimento de patógenos sem qualquer efeito tóxico à saúde humana ou alterações nas características sensoriais dos alimentos (BHARTI, V., A. MEHTA, S. SINGH, N. JAIN, L. AHIRWAL, 2015).

O efeito inibitório contra os microrganismos patogênicos pode ser resultado de competição por nutrientes, espaços de colonização e/ou produção de compostos inibitórios tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e enzimas (OLIVEIRA et al., 2018). Espécies de *Lactobacillus* são bem documentadas com propriedades probióticas e atividade antimicrobiana (THUY et al., 2018). As culturas bioprotetoras atuam com mecanismos específicos, como as bacteriocinas ou substâncias de baixo peso molecular. As bacteriocinas são peptídeos codificados de 20 a 40 aminoácidos ativos. A maioria das bacteriocinas e metabólitos antimicrobianos são resistentes ao calor. Assim, são capazes de resistir aos processos térmicos como a pasteurização, por exemplo (INGLIN et al., 2018).

Para selecionar possíveis culturas protetoras, as cepas devem ser rastreadas fenotipicamente e apresentar características de inibição. Assim, as cepas candidatas são primeiramente testadas sob condições que simulam a matriz alimentar específica, como fermentação de fontes de carbono diferentes, baixa resistência ao pH, tolerância ao sal e capacidade de crescer em baixas ou altas temperaturas. Além disso, uma triagem genotípica deve ser realizada para acessar a segurança das cepas. A presença de genes transferíveis de resistência a antibióticos e genes que codificam fatores de virulência são indesejados por razões de segurança e produção (INGLIN et al., 2018).

1.8 DETECÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM ALIMENTOS

A compreensão sobre os ecossistemas microbianos sempre se mostrou dependente de técnicas clássicas da microbiologia (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998), as quais são baseadas na capacidade de um microrganismo de crescer e multiplicar-se em determinados meios de cultura e condições de crescimento (NOCKER; CAMPER, 2008). Entretanto, nos últimos anos as abordagens utilizadas em análises microbiológicas tem sido alvo de grandes mudanças (COCOLIN et al., 2013).

O método de contagem padrão de placas é o principal e mais tradicional método utilizado na microbiologia aplicada. Os protocolos seguem uma série de etapas que iniciam com a preparação e diluição da amostra, seguido de plaqueamento sob ou sobre um ágar específico e incubado na temperatura adequada ao microrganismo em questão. Em seguida, as colônias são contadas após o tempo de incubação determinado (NEMATI et al., 2016).

As técnicas clássicas da microbiologia são ditas específicas, visto que cada método é utilizado de forma específica para um determinado grupo de microrganismo e muitas vezes necessitando ainda de testes bioquímicos confirmatórios. Além disso, se o objetivo do analista é detectar e/ou quantificar células viáveis, mas não cultiváveis ou populações numericamente menores, essa abordagem pode ser questionada. Por fim, essas metodologias apesar de serem consideradas de operação simples, são técnicas que consomem quantidades elevadas de reagentes e materiais e demandam dias para conhecer o laudo final da análise. Dessa maneira, como uma alternativa aos inconvenientes encontrados na utilização de métodos dependentes de cultivo, surgem os métodos chamados independentes de cultivo, cujo princípio está baseado em análises diretas do DNA ou RNA extraído da matriz da amostra (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013; ELIZAQU; AZNAR, 2013; MEDICI et al., 2015; TABASCO; PELA; REQUENA, 2009).

A partir da incorporação dos métodos independentes de cultivo em análises microbiológicas, foi possível compreender que inúmeros microrganismos encontrados na natureza não são cultiváveis utilizando-se técnicas convencionais. Desta maneira, as pesquisas utilizando os métodos independentes de cultivo foram ainda mais impulsionadas em diferentes campos da microbiologia (COCOLIN et al., 2013).

Na microbiologia de alimentos, foi no fim dos anos 90 que o estudo das populações presentes em alimentos fermentados começou a ganhar destaque no meio científico. Logo nos primeiros trabalhos desenvolvidos utilizando-se as metodologias independentes de cultivo observou-se a presença de populações microbianas não

cultiváveis que até então não tinham sido detectadas através dos métodos tradicionais. Nesse contexto, surgiu o termo bactérias viáveis, mas não cultiváveis, definido por Oliver (1993) como “uma célula que está metabolicamente ativa, mas é incapaz de submeter-se a divisão celular necessária para o crescimento em/ou sobre um meio de cultura específico”.

Medici et al., (2015) apresentaram uma revisão onde descreveram o contexto e as perspectivas dos métodos baseados na PCR. Os autores mostraram as tendências em pesquisa e desenvolvimento destinado a solucionar os desafios encontrados na microbiologia, para que possam integrar os métodos com abordagens moleculares no controle de segurança e qualidade de alimentos. Como conclusão, citaram que o apoio à implementação dos métodos moleculares deve ser priorizado através da normalização dos métodos pelos órgãos responsáveis, o que facilitaria a aceitação pela indústria e consumidores das análises de controle de qualidade de alimentos baseado na presença de ácidos nucleicos.

Achilleos; Berthier (2013) realizaram importantes trabalhos com enfoque nos métodos moleculares para *Lactobacillus* spp., a fim de investigar a microbiota em queijos em termos de diversidade, dinâmica e atividade. Proporcionaram desta maneira, uma visão geral dos benefícios e limitações encontrados nos métodos independentes de cultivo baseados na PCR.

Segundo Cocolin et al., (2013) a utilização dos métodos independentes de cultivo na microbiologia de alimentos é relativamente nova e os últimos 15 anos tem sido de grandes conquistas para aqueles que estudam a ecologia microbiana dos alimentos. Numa revisão onde mostram os métodos independentes de cultivo como uma forma para avaliar a diversidade e dinâmica da microbiota presente durante a fermentação de diferentes alimentos, os autores concluem que ao longo dos próximos anos as metodologias disponíveis para tais objetivos devem aumentar.

1.9 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS POR QPCR EM ALIMENTOS

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) representa a técnica base dos métodos independentes de cultivo. Em suas fases precoces na microbiologia de alimentos, a PCR era utilizada como método para detecção e identificação do microrganismo. Hoje, a PCR inclui contribuições notáveis, oferecendo aos cientistas a possibilidade de estudar a ecologia dos ecossistemas microbianos por completo. Diante de sua evolução para PCR

quantitativa (qPCR) (ANDERSEN et al., 2006), essa técnica contribuiu ainda mais para a conveniência e escolha da mesma ferramenta para o desenvolvimento de inúmeros estudos (COCOLIN et al., 2013).

A Reação em Cadeia da Polimerase é baseada no processo de replicação do DNA, ou seja, consiste em multiplicar sequências específicas de DNA de forma que possam ser detectadas (HEID, 1996). A amplificação seletiva do DNA é realizada *in vitro*, em condições controladas e na presença de iniciadores e da enzima DNA Polimerase. Os iniciadores (*primers*) são oligonucleotídeos de fita simples de DNA que apresentam de dez a trinta bases nitrogenadas em uma sequência complementar à sequência de interesse. A PCR quantitativa permite monitorar a amplificação de um fragmento de DNA alvo durante toda a reação através dos produtos formados, baseado no acompanhamento do aumento do sinal fluorescente gerado durante a reação (HEID, 1996).

Comparada à outras técnicas disponíveis, permite a detecção de um ácido nucleico de maneira rápida, específica e sensível. Além disso, permite a quantificação absoluta inicial de um gene alvo.

A qPCR apresenta três fases distintas: (a) fase lag, onde ainda não há amplificação suficiente para ser detectada; (b) fase exponencial, onde a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo e (c) platô, que corresponde ao fim da reação, pois não há aumento do número de produtos de amplificação. Durante a fase exponencial é onde ocorre a quantificação de DNA, pois nessa fase é gerado um acúmulo de produtos amplificados, com consequente aumento da emissão de fluorescência. O ciclo onde o sinal fluorescente emitido ultrapassa o limiar de detecção de sinal (*quantification*) permite inferir a concentração inicial do DNA alvo para cada amostra. O limiar de detecção é definido dentro da fase exponencial, no ponto em que as réplicas sejam mais coincidentes (HEID, 1996).

O ciclo quantificação (C_q) é o ciclo onde a curva de amplificação de cada DNA alvo cruza a linha do limiar de fluorescência. Quanto maior for a quantidade inicial do alvo, mais cedo ocorre um aumento significativo da fluorescência e mais baixo será o valor de C_q (WEIGHARDT, 2006).

Segundo Ndoye et al., (2011) os fatores-chaves para utilização de uma abordagem molecular na análise microbiológica são: o método usado para extração dos ácidos nucleicos (qualidade), a região alvo a ser amplificada (iniciadores específicos) e a distinção entre microrganismos viáveis e não viáveis. Falentin et al., (2010) ainda menciona a importância do uso de controles positivos e negativos durante a reação.

A técnica qPCR tem-se mostrado cada vez mais interessante, pois é possível a obtenção de resultados tanto qualitativos, que destacam a ausência e/ou presença da sequência de DNA de interesse, quanto resultados quantitativos (NAVARRO, 2015). Além disso, a técnica apresenta alta sensibilidade, resultados com rendimentos elevados, sistema automatizado, vantagem de não requerer procedimentos pós-reação e ainda o risco de contaminação que se torna extremamente reduzido, visto que a reação e análise são realizadas em confinamento (LÓPEZ-CALLEJA et al., 2013).

Nas análises microbiológicas, a utilização da qPCR tem resolvido alguns inconvenientes que são encontrados nas técnicas clássicas dependentes de cultivo e por isso tem sido amplamente utilizada na detecção e quantificação de microrganismos presentes em alimentos. Inúmeros estudos têm demonstrado que a qPCR tornou-se uma poderosa ferramenta para a detecção e quantificação de bactérias ácido lácticas, em especial aquelas pertencentes ao grupo *L. casei*, já que essas são difíceis de serem distinguidas e quantificadas por técnicas clássicas da microbiologia.

Kao, Y.-T.; Liu, Y.-S.; Shyu (2007) desenvolveram um ensaio de qPCR para a identificação rápida de cepas de BAL em produtos probióticos. Utilizando-se como alvo o gene 16S rRNA, foi possível identificar as cepas *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, entretanto não foi possível discriminar as cepas *L. paracasei* e *L. casei*.

Bottari et al., (2013) realizaram um ensaio de qPCR multiplex para rastrear a composição microbiana de culturas *starters* de queijos cozidos duros. Os iniciadores tinham como alvo o gene *PHES* e foram utilizados para detecção múltipla de *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* e *L. fermentum*. O ensaio foi capaz de descrever a população microbiana de todas as diferentes amostras avaliadas e demonstrou valores de quantificação maiores para as cepas de *S. thermophilus* e *L. fermentum* sugerindo assim que essas poderiam ser mais frequentes nas amostras avaliadas.

Tailliez; Furet; Que, (2004) desenvolveram ensaio de qPCR para quantificação absoluta de BAL (*Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii*) em produtos lácteos fermentados. O ensaio permitiu a identificação de todas as espécies de BAL presentes nos produtos e a quantificação das mesmas foi precisa, com um limite de detecção de 10^3 UFC mL⁻¹ de produto.

Herbel et al. (2013), com o objetivo de identificar e quantificar espécies de *Lactobacillus* comercialmente importantes, desenvolveram um ensaio de qPCR tendo

como alvo o gene *hsp60*. Foram identificadas as espécies de *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. reuteri* em produtos lácteos como iogurte. O ensaio permitiu a detecção de espécies em contagem 10^5 UFC mL⁻¹ de iogurte, o que é considerado uma quantidade suficiente de detecção desses produtos que geralmente contém cerca de 10^6 a 10^{12} UFC mL⁻¹ de cepas.

Poucos estudos têm reportado ensaios de qPCR para quantificação de *L. paracasei* (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013). Alguns ensaios de qPCR, tendo como alvo os genes *16S rRNA*, *groL* ou *tuf* têm sido mencionados para a quantificação de *L. paracasei* (FALENTIN et al., 2010; TAILLIEZ; FURET; QUE, 2004). Tailliez; Furet; Que, (2004) não foram precisos quanto a especificidade dos iniciadores para *L. paracasei*, enquanto que Falentin et al., (2010) observaram amplificações cruzadas dos iniciadores tendo como alvo os genes *groL*, *tuf* e *16S rRNA* com espécies estritamente relacionadas com *L. paracasei*: *L. rhamnosus* e *L. casei*.

Entre os alvos propostos para diferenciação de BAL, o gene *tuf* tem se mostrado altamente variável (menos conservado) entre espécies de bactérias ácido lácticas, especialmente aquelas com características semelhantes entre si, como as espécies do grupo *L. casei* e por isso tem sido considerado um alvo interessante para detecção de seqüências dos membros do gênero *Lactobacillus* (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013).

Achilleos; Berthier, (2013) propuseram o uso do gene *tuf* para quantificar *L. paracasei* em queijo e compararam os resultados de quantificação por qPCR e contagem UFC mL⁻¹ em placa. Os autores observaram valores maiores na quantificação por qPCR do que pelo método tradicional em placa, o que foi atribuído à quantificação simultânea de células viáveis e não viáveis durante a qPCR.

Ilha et al., (2015) compararam a enumeração de *L. paracasei* isolado de fermento natural de uva pelo método de contagem de UFC mL⁻¹ em placa com um ensaio de quantificação por qPCR, tendo como alvo o gene *tuf* em amostras de iogurte probiótico. O ensaio de qPCR mostrou ser uma ferramenta adequada e rápida para a enumeração de *L. paracasei* em iogurte probiótico, entretanto, neste trabalho não foi realizada a distinção entre células viáveis e células não viáveis.

1.10 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS E NÃO VIÁVEIS POR PMA-QPCR

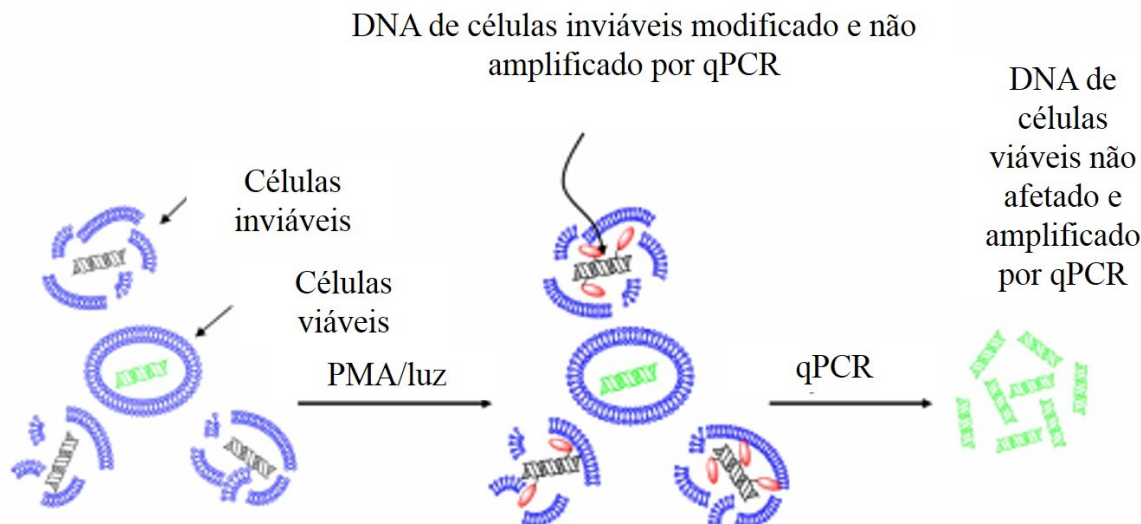
Uma vez que o DNA é capaz de persistir no ambiente mesmo após as células perderem a viabilidade, os resultados da qPCR podem superestimar o número de células viáveis ou apresentar resultados falso-positivos, visto que a técnica não é capaz de diferenciar células viáveis e não viáveis (NOCKER; CAMPER, 2008).

A incapacidade de diferenciação de células é vista como a maior desvantagem da qPCR durante análises de detecção e/ou quantificação de microrganismos alvo em amostras de alimentos, ambientais e clínicas (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

Uma alternativa para a detecção de somente células viáveis durante a qPCR foi apresentada em 2003 por Nogva e colaboradores, ao introduzirem o conceito de EMA-PCR (NOGVA, 2003). Alguns anos depois, com o surgimento do termo PMA-PCR, essa nova abordagem tornou-se ainda mais sólida (NOCKER et al., 2006).

Monoazida de etídio (EMA) e monoazida de propídio (PMA) são corantes intercalantes de DNA que quando expostos à uma fonte luz halógena são capazes de intercalar no DNA de células com membranas danificadas/injuriadas. Assim, a distinção entre células viáveis e inviáveis é baseada na integridade da membrana celular, onde células com membranas intactas representam uma barreira para as moléculas de corantes intercalantes (ELIZAGU; AZNAR, 2013; ELIZAGUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012; FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012). As amostras de microrganismos são tratadas com um dos corantes intercalantes de DNA e, uma vez dentro da célula não viável, o corante intercala na fita dupla de DNA através de ligações covalentes e para tanto, é necessário que a amostra seja exposta à luz, devido a presença do grupamento azida. A fotólise converte o grupo azida em um radical nitrogênio altamente reativo, que é capaz de reagir com uma molécula orgânica próxima. Ao mesmo tempo, quando a ligação ocorre com o DNA, qualquer excesso de corante reage com moléculas de água que previnem a reação posterior do corante com o DNA extraído de células intactas (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012; NOCKER; CAMPER, 2008). Ao fim do tratamento, a modificação com os corantes rende um DNA insolúvel, o qual não é extraído durante o protocolo de extração de DNA ou terá rendimentos baixos, além de ter a amplificação durante a qPCR bloqueada e não ser detectado (Figura 3) (YANG; BADONI; GILL, 2011).

Figura 3: Esquema representativo da reação de células viáveis e não viáveis com monoazida de propídio em conjunto com a técnica qPCR. O DNA de células não viáveis torna-se incapaz de amplificação por qPCR e somente o DNA de células viáveis é detectado.



Fonte: Adaptado de Nocker; Cheung; Camper (2006).

Embora os dois corantes intercalantes de DNA comportem-se de maneira bem semelhante, eles diferem no que diz respeito à permeabilidade através das membranas celulares. Assim, embora as nítidas vantagens, há evidências demonstrando que a qPCR em conjunto com os corantes tem limitações práticas e teóricas, especialmente quando aplicada a amostras complexas. O corante EMA apresenta falta de especificidade para células bacterianas intactas, enquanto com o monoazida de propídio a preocupação é a geração de sinais falsos positivos devido a supressão incompleta dos sinais. Portanto, devido a sua composição química, o EMA é considerado mais eficaz na supressão de sinais que PMA, entretanto, PMA é mais eficaz do que EMA em termos de discriminação de células viáveis e não viáveis. A combinação da técnica qPCR acoplada aos corantes com os métodos clássicos da microbiologia pode ser uma alternativa para a confirmação dos resultados obtidos (ELIZAQU; AZNAR, 2013; FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

Quando utiliza-se os corantes EMA e PMA, é necessário considerar alguns fatores que podem influenciar diretamente nos resultados finais, dentre os quais destacam-se: a escolha do corante, a concentração do mesmo, as condições de incubação, a fonte de luz e ainda aspectos relacionados com a amostra em estudo, como a concentração de sal, a turbidez e o pH. Fatores como o tamanho do gene alvo e a

sequência também são extremamente importantes durante a qPCR (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

Em amostras de alimentos a utilização de qPCR, acoplada aos corantes intercalantes de DNA, tornou-se uma ferramenta valiosa na detecção e quantificação de microrganismos viáveis. Entretanto, amostras de alimentos geralmente são consideradas matrizes complexas por apresentarem componentes como gordura, proteínas, polissacarídeos e polifenóis, os quais podem afetar diretamente a eficiência da qPCR, que representa um dos pontos críticos da análise (KRAMER, 2009). A eficiência da qPCR quando utilizando EMA ou PMA é afetada por contaminantes em diferentes pontos da análise, diminuindo a concentração efetiva do corante por adsorção química, prevenindo a fotoativação devido a presença de compostos orgânicos, interferindo na lise das células, degradando ácidos nucleicos ou inibindo a atividade da enzima DNA polimerase (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012). Portanto, é necessário a utilização de um método de extração de DNA altamente confiável.

Os processos de controle de crescimento de microrganismos utilizados em alimentos podem não causar diretamente a injúria das membranas celulares e assim, seria uma barreira ao uso dos corantes intercalantes de DNA na diferenciação de células viáveis e não viáveis por qPCR. Como exemplo, Nocker et al., (2007) não foram capazes de diferenciar *E. coli* viáveis e não viáveis após tratamento das amostras com luz UV. Por outro lado, Yang; Badoni; Gill (2011) demonstraram que amostras de suspensões de *E. coli* submetidas a tratamento térmico com temperatura maior que 80 °C foram permeáveis ao PMA e logo, foi possível a diferenciação das células viáveis e não viáveis.

Desde o início da utilização dos corantes EMA e PMA, os mesmos têm sido aplicados a uma vasta gama de microrganismos (Tabela 2) incluindo células vegetativas de bactérias (NOCKER; CAMPER, 2008); fungos; vírus; leveduras e protozoários (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

Tabela 2: Aplicações dos corantes intercalantes de DNA para detecção de células viáveis de bactérias em diferentes matrizes alimentares.

Matriz Alimentar	Microrganismo Alvo	Corante	Referência
<i>Produtos lácteos</i>			
Iogurte probiótico	<i>L. paracasei</i>	PMA	(SCARIOT et al., 2018)
Leite	<i>Bacillus cereus</i>	PMA	(ZHOU et al., 2019)
Leite fermentado	Bactéria ácido láctica	PMA	(MO et al., 2019)
Iogurte	<i>Bifidobacterium</i>	EMA	(MENG et al., 2010)
Leite fermentado	Bactéria ácido láctica	PMA	(PORCELLATO; MAGRI; NARVHUS, 2015)
Queijo petit-suisse	Bactéria ácido láctica	PMA	(VILLARREAL et al., 2013)
<i>Carnes</i>			
Carne de porco	<i>Salmonella</i>	PMA	(ZHAI et al., 2019)
Bife	<i>E. coli</i> O157:H7	PMA	(LAIDLAW; GÄNZLE; YANG, 2019)
Camarão	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	PMA	(LING et al., 2020)
<i>Vegetais</i>			
Alface	<i>Salmonella</i>	PMA	(WANG et al., 2014)
Espinafre	<i>E. coli</i> O157:H7	PMA	(ELIZAQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012)

Fonte: AUTOR, 2020.

Tabasco; Pela; Requena (2009) descreveram um ensaio de qPCR usando PMA que permitiu a detecção e quantificação específica de células viáveis de 4 espécies de BAL (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* e *Lactobacillus acidophilus*) e *Bifidobacterium lactis* misturadas em leites fermentados. Concluíram que o método desenvolvido mostrou-se eficiente para a discriminação, identificação e quantificação das bactérias viáveis nos produtos analisados.

Kramer (2009) avaliaram a possibilidade de uso do corante monoazida de propídio em combinação com qPCR e o kit de viabilidade *Live/Dead BacLight* em conjunto com citometria de fluxo (FCM) para determinar bactérias probióticas viáveis em produtos liofilizados contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium lactis* BB-12. Concluíram que a determinação de viabilidade de bactérias probióticas por qPCR e FCM podem complementar a quantificação dos microrganismos por métodos de contagem em placa.

Desfossés-foucault et al., (2012) investigaram a viabilidade comercial de cepas probióticas durante a fabricação e maturação de queijo *cheddar* comparando a eficiência

de abordagens moleculares e microbiológicas. Comprovou-se a eficiência dos métodos moleculares no acompanhamento das cepas probióticas no queijo *cheddar* utilizando-se monoazida de propídio em combinação com qPCR.

Theres et al., (2014) avaliaram a qualidade microbiológica de águas de fontes urbanas e rurais através de qPCR combinado com PMA. Os resultados foram comparados com os obtidos por métodos convencionais para a investigação de *E. coli*, *Enterococcus* ssp. E *P. aeruginosa*. Os autores concluíram que a qPCR em conjunto com o PMA mostrou ser uma ferramenta valiosa para a detecção rápida de parâmetros das condições higiênico-sanitárias.

Porcellato, Magri, Narvhus (2015) investigaram a dinâmica da microbiota de dois produtos lácteos fermentados, iogurte e kefir, usando métodos independentes de cultivo, em combinação com o corante de viabilidade PMA. O uso da qPCR em conjunto com o PMA mostrou um quadro mais completo da microbiota viável nos leites fermentados durante o tempo de armazenamento.

1.11 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana pode ser utilizada para a descoberta de novos medicamentos, epidemiologia e previsão de resultados terapêuticos. Os produtos naturais, em especial aqueles advindos de microrganismos e plantas ocupam a maior parte dos compostos antimicrobianos descobertos até hoje (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2015).

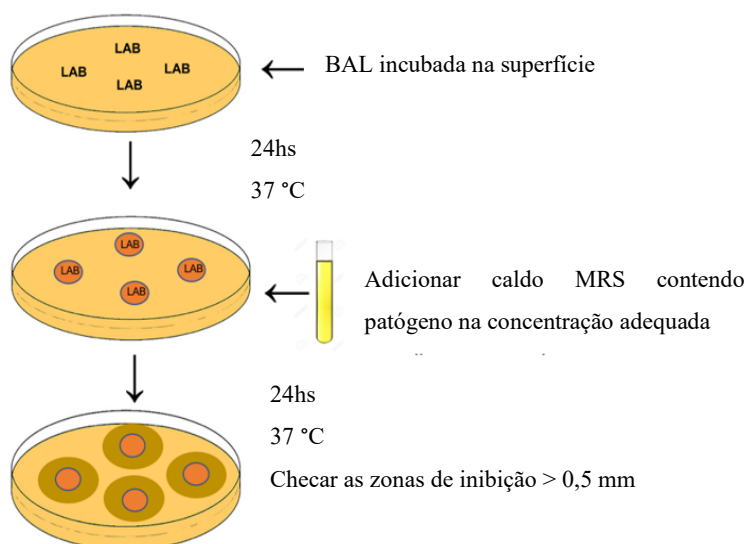
Uma variedade de métodos laboratoriais pode ser usada para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de um extrato ou um composto puro. Os métodos mais conhecidos, estudados e utilizados são os métodos conhecidos como Ensaio de Ponto e Ensaio de Difusão em Poço, do inglês *agar spot assay* e *agar well diffusion assay*, respectivamente.

Inúmeros fatores podem afetar a susceptibilidade dos métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de microrganismos e/ou compostos. Entre os principais, destacam-se: meios de cultura, pH, disponibilidade de oxigênio, inóculo e condições de incubação. É necessário a padronização de todas as etapas durante o *screening* de atividade antimicrobiana, afim de garantir a veracidade dos resultados.

1.11.1 Ensaio de Ponto

O ensaio de ponto é baseado na inoculação pontual do microrganismo que pode apresentar o efeito antimicrobiano em placas com meio de cultura específicos e depois, a cultura patogênica é adicionada recobrendo a superfície do microrganismo a ser testado. A atividade antimicrobiana é avaliada através do aparecimento de zonas claras ao redor do inóculo em “ponto” do microrganismo. Essas zonas são chamadas de zonas de inibição e podem surgir em diversos tamanhos. É necessário o auxílio de um paquímetro ou softwares especiais de análise de imagens para medir o diâmetro das zonas e assim compreender a atividade antagonista apresentada (Figura 4).

Figura 4: Esquema ilustrativo do método *Agar spot* para avaliação da atividade antimicrobiana.



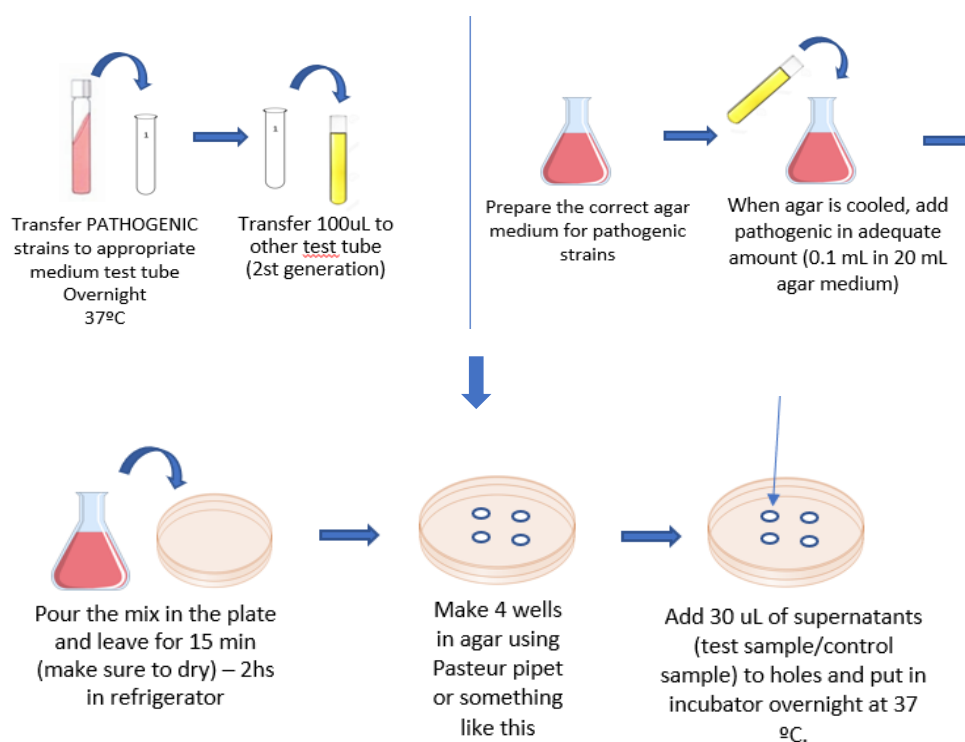
Fonte: Autor, 2020.

1.11.2 Ensaio de Difusão em Poço

O método de difusão em poço baseia-se na inoculação do microrganismo patogênico diretamente no meio de cultura específico e depois, vertido na placa. Após a incubação de acordo com as condições ótimas de crescimento, são feitos poços de aproximadamente 6-8 mm e adicionados os sobrenadantes do microrganismo que está sendo avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana. Assim, o agente antimicrobiano difunde pela placa e inibe o crescimento do patógeno (Figura 5).

O sobrenadante do microrganismo a ser avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana pode ser testado sob diversas condições. Por exemplo, pode ser utilizado o sobrenadante filtrado ou não. A filtração do cultivo bacteriano retirará as células bacterianas, permanecendo somente as substâncias antimicrobianas. Assim, o aparecimento de zonas de inibição pode ser resultado da ação de compostos antimicrobianos produzidos e secretados pela bactéria e não pela presença da mesma. Além disso, é possível modificar o pH do sobrenadante (pH 6,5) para eliminar o efeito putativo dos ácidos orgânicos produzidos.

Figura 5: Esquema ilustrativo do método de difusão em poço para avaliação da atividade antimicrobiana.



Fonte: Autor, 2020.

REFERÊNCIAS

- ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286–295, 2013.
- AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168–169, p. 57–62, 3 jan. 2014.
- AKKAYA, L. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* in Ayran, a traditional Turkish fermented drink. **MLJEKARSTVO**, v. 65, n. 2, p. 130–137, 2015.
- ANDERSEN, C. B. et al. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658–9663, 27 dez. 2006.
- ANTUNOVIC, B. et al. Influence of milk product type and its initial contamination on the efficiency of different methods for detection of *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. **MLJEKARSTVO**, v. 68, n. 1, p. 3–11, jan. 2018.
- ANUKAM, K. C.; REID, G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 466–474, 2007.
- BACHROURI, M.; QUINTO, E. J.; MORA, M. T. Kinetic parameters of *Escherichia coli* O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 5, p. 474–481, maio 2006.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity :

A review \$. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2015.

BASU, S. et al. Controlled release of microencapsulated probiotics in food matrix. **Journal of Food Engineering**, v. 238, p. 61–69, 1 dez. 2018.

BHARTI, V., A. MEHTA, S. SINGH, N. JAIN, L. AHIRWAL, AND S. M. BACTERIOCIN: A NOVEL APPROACH FOR PRESERVATION OF FOOD. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1–10, 2015.

BOLLAERTS, K. et al. Human Salmonellosis: Estimation of dose-illness from outbreak data. **Risk Analysis**, v. 28, n. 2, p. 427–440, abr. 2008.

BOLOTIN, A. et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome research**, v. 11, n. 5, p. 731–753, 2001.

BOTTARI, B. et al. Development of a multiplex real time PCR to detect thermophilic lactic acid bacteria in natural whey starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 290–297, 2013.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento**, 2007.

BRASIL. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.**, 2008.

BRASIL. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**, 2010.

BRASIL. **RDC nº 241 de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos.**Brasil, 2018.

CAPOZZI, V. et al. Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. **Fermentation**, v. 3, n. 4, 1 dez. 2017.

CAPRIOLI, A. et al. **Enterohaemorrhagic Escherichia coli: Emerging issues on virulence and modes of transmission** **Veterinary Research**, maio 2005.

CAROLINA, F.; BURITI, A.; ISAY, M. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei* : caracterização , viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. v. 57, n. 10, 2007.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey. v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.

CHIANG, S.; PAN, T. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 903–916, 2012.

COCOLIN, L. et al. International Journal of Food Microbiology Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. v. 167, p. 29–43, 2013.

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Specific probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 1, p. 58–64, ago. 2008.

CORBO, M. R. et al. Selection of promising lactic acid bacteria as starter cultures for sourdough: using a step-by-step approach through quantitative analyses and statistics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 9, p. 1772–1780, 2014.

CUTRIM, C. S. et al. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 during manufacture and storage of traditional and low lactose yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 70, p. 178–184, 1 jul. 2016.

DARGAHI, N. et al. Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat

allergies and autoimmune diseases? **Maturitas**, v. 119, p. 25–38, 1 jan. 2019.

DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains : Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria ☆. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 9–17, 2014.

DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. **Food Biotechnology**, v. 111, p. 1–66, 2008.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. **Journal Molecular Microbiology Biotechnoly**, v. 13, n. 4, p. 194–199, 2007.

DESFOSSÉS-FOUCAULT, É. et al. Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. v. 3, n. October, p. 1–11, 2012.

DOS REIS, D. L.; COUTO, E. P.; RIBEIRO, J. L.; NERO, L. A.; DE AGUIAR FERREIRA, M. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3161–3172, 2014.

ELIZACQU, P.; AZNAR, R. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. p. 1–13, 2013.

ELIZACQUÍVEL, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne E . coli O157 : H7 , *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 704–708, 2012.

FALENTIN, H. et al. Specific metabolic activity of ripening bacteria quanti fi ed by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 10–19, 2010.

FARROKH, C. et al. **Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production** *International Journal of Food Microbiology* Elsevier B.V., , 5 mar. 2013.

FASFC, S. **Scientific Committee Federal Agency for the Safety of the Food.** **WETENSCHAPPELIJK COMITE van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen.** [s.l: s.n.].

FELIS, G. E. et al. Comparative sequence analysis of a recA gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the Lactobacillus casei group. p. 2113–2117, 2001.

FERREIRA, C. L. D. L. F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*. 2003.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification ☆. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 2, p. 276–289, 2012.

FOOD PROCESSING, F. . Modest Growth for Probiotic Ingredients. 2014.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365–378, 1989.

GALDEANO, C. M.; PERDIGON, G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 673–681, out. 2004.

GANESAN, B. et al. Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 6, p. 1642–1656, jun. 2014.

GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and

real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6–7, p. 405–409, jun. 2009.

GEMECHU, T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 4, p. 170–175, 2015.

GILLESPIE, I. A. et al. Changing pattern of human listeriosis, England and Wales, 2001-2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1361–1366, 2006.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **RESEARCH IN MICROBIOLOGY**, v. 161, n. 6, SI, p. 480–487, 2010.

GKOGKA, E. et al. The application of the Appropriate Level of Protection (ALOP) and Food Safety Objective (FSO) concepts in food safety management, using *Listeria monocytogenes* in deli meats as a case study. **Food Control**, v. 29, n. 2, p. 382–393, fev. 2013.

GOULD, L. H. et al. Hemolytic Uremic Syndrome and Death in Persons with *Escherichia coli* O157:H7 Infection, Foodborne Diseases Active Surveillance Network Sites, 2000–2006 . **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 10, p. 1480–1485, 15 nov. 2009.

GOULET, V. et al. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 5, p. 652–660, 1 mar. 2012.

GRATTEPANCHE, F.; LACROIX, C. Production of viable probiotic cells. In: **Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 321–352.

HEID, C. A. ET AL. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996.

HERBEL, S. R. et al. Species-specific quantification of probiotic lactobacilli in yoghurt by quantitative real-time PCR. n. Stiles 1996, 2013.

HILL, C. et al. STATEMENTS The International Scientific Association for. v. 11, n. August 2014, 2015.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765–4774, 1998.

HUMMEL, S. et al. Differential targeting of the E-cadherin/ β -catenin complex by gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1140–1147, fev. 2012.

ILHA, E. C. et al. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, 2015.

INGLIN, R. C. et al. An approach to select *Lactobacillus* isolates as protective cultures for food fermentations. n. April, 2018.

JOHNSON, B. R.; KLAENHAMMER, T. R. Impact of genomics on the field of probiotic research: historical perspectives to modern paradigms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 141–156, 2014.

KAMAL, R. M. et al. Bio-controlling capability of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* against some common foodborne pathogens in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 85, p. 1–7, 2018.

KAO, Y.-T.; LIU, Y.-S.; SHYU, Y.-T. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food Research International**, v. 40, n. 1, p. 71–79, 2007.

KHEDKAR, S.; CARRARESI, L.; BRÖRING, S. Food or pharmaceuticals? Consumers' perception of health-related borderline products. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 4, p. 133–140, 1 dez. 2017.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103–125, 1998.

KRAMER, M. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. p. 1137–1147, 2009.

LAIDLAW, A. M.; GÄNZLE, M. G.; YANG, X. Comparative assessment of qPCR enumeration methods that discriminate between live and dead *Escherichia coli* O157:H7 on beef. **Food Microbiology**, v. 79, p. 41–47, 1 jun. 2019.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. **Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: Comparison with commensals and pathogens** *Nature Reviews Microbiology*, mar. 2010.

LEE, S. J. et al. Effects of Dietary Synbiotics from Anaerobic Microflora on Growth Performance, Noxious Gas Emission and Fecal Pathogenic Bacteria Population in Weaning Pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 22, n. 8, p. 1202–1208, 26 jun. 2009.

LING, N. et al. Rapid and accurate detection of viable *Vibrio parahaemolyticus* by sodium deoxycholate-propidium monoazide-qPCR in shrimp. **Food Control**, v. 109, 1 mar. 2020.

LÓPEZ-CALLEJA, I. M. et al. Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 480–490, 1 abr. 2013.

MACK, D. R. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, v. 52, n. 6, p. 827–833, 1 jun. 2003.

MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid

bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2578–2590, 2014.

MANTZOURANI, I. et al. Potential of the Probiotic *Lactobacillus Plantarum* ATCC 14917 Strain to Produce Functional Fermented Pomegranate Juice. **Foods**, v. 8, n. 1, p. 4, 22 dez. 2018.

MATTAR, A. F. et al. **Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model**. *Pediatric Surgery International*. **Anais...out**. 2002.

MCINGVALE, S. C. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in buttermilk as affected by contamination point and storage temperature. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 4, p. 441–444, 2000.

MCLAUHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15–33, 1 abr. 2004.

MEDICI, D. DE et al. Rapid Methods for Quality Assurance of Foods : the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR) -Based Food Monitoring. n. 1, p. 255–271, 2015.

MENG, X. C. et al. Rapid and direct quantitative detection of viable bifidobacteria in probiotic yogurt by combination of ethidium monoazide and real-time PCR using a molecular beacon approach. p. 498–504, 2010.

MO, L. et al. Investigating the bacterial microbiota of traditional fermented dairy products using propidium monoazide with single-molecule real-time sequencing. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 3912–3923, 1 maio 2019.

NAVARRO, E. ET AL. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.

NDOYE, B. et al. **A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota** *Dairy Science and Technology*, set. 2011.

NEMATI, M. et al. **An overview on novel microbial determination methods in pharmaceutical and food quality control** *Advanced Pharmaceutical Bulletin* Tabriz University of Medical Sciences, , 1 jan. 2016.

NIKODINOSKA, I. et al. *LWT - Food Science and Technology* Protective cultures against foodborne pathogens in a nitrite reduced fermented meat product. v. 101, n. November 2018, p. 293–299, 2019.

NOCKER, A. et al. Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. v. 72, n. 3, 2006.

NOCKER, A. et al. Use of Propidium Monoazide for Live / Dead Distinction in *Microbial Ecology* □. v. 73, n. 16, p. 5111–5117, 2007.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. 2008.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs . dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. v. 67, p. 310–320, 2006.

NOGVA, H. K. ET AL. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. **Biotechniques**, v. 34, n. 4, 2003.

O'MAY, G. A.; MACFARLANE, G. T. Health claims associated with probiotics. **Probiotic dairy products**, p. 138–166, 2005.

OLIVEIRA, M. et al. Biocontrol strategies for Mediterranean-style fermented sausages. **Food Research International**, v. 103, n. July 2017, p. 438–449, 2018.

PARADA, J. L. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 3, p.

512–542, 2007.

PATEL, S.; MAJUMDER, A.; GOYAL, A. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 1, p. 3–12, 2012.

PATRIGNANI, F. . Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 1–11, 2006.

PAULINA MARKOWIAK; KATARZYNA SLIZEWSKA. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 1021, p. 1–30, 2017.

PERES, C. M.; PERES, C.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, F. X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 31–42, 2012.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. v. 15, n. 12, 2007.

PORCELLATO, D.; MAGRI, M.; NARVHUS, J. Viable cells differentiation improves microbial dynamics study of fermented milks. v. 47, p. 136–142, 2015.

RAVULA, R. R.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. v. 12, n. 11, p. 819–822, 2008.

REDDY, G. et al. **Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review** **Biotechnology Advances**, jan. 2008.

REDDY, L. V.; MIN, J.; WEE, Y. Production of Probiotic Mango Juice by Fermentation of Lactic Acid Bacteria. v. 43, p. 120–125, 2015.

RICCI, A. et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6: suitability of taxonomic units notified to

EFSA until 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 3, 2017.

RIVERA-REYES, M.; CAMPBELL, J. A.; CUTTER, C. N. Survival of acid-adapted and non-adapted Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using an in vitro model. **Food Control**, v. 104, n. November 2018, p. 28–33, 2019.

ROBERTS, D. et al. LWT - Food Science and Technology Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, n. April, p. 144–150, 2018.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. Real-time PCR in Food Science : Introduction. p. 25–38, [s.d.].

SAKAI, T. et al. M-RTL V agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 154–160, maio 2010.

SCALLAN, E. et al. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 13, p. 2795–2804, 7 out. 2015.

SCARIOT, M. C. et al. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, n. August 2017, p. 1–7, 2018.

SCHIFFRIN, E. J.; BLUM, S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S60–S64, 2002.

SERAPEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; LASKARIDIS, K. .; SAGREDOS, A. Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. **Food Chemistry**, v. v. 134, n. 4, p. 1839–1846, 2012.

SERVIN, A. L. **Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against**

microbial pathogens *FEMS Microbiology Reviews*, 1 out. 2004.

SEYOUM, E. T. et al. Prevalence of listeria monocytogenes in raw bovine milk and milk products from central highlands of Ethiopia. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 11, p. 1204–1209, 1 nov. 2015.

SIDOOSKI, T. et al. Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 17, p. 2839–2849, 25 set. 2019.

SONG, D.; IBRAHIM, S.; HAYEK, S. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. p. 3–36, 2012.

Statista. 2019.

STEVENS, M. P.; HUMPHREY, T. J.; MASKELL, D. J. **Molecular insights into farm animal and zoonotic salmonella infections** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* Royal Society, , 27 set. 2009.

SUN, Z. et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. **Nature Communications**, v. 6, 29 set. 2015.

TABASCO, R.; PELA, C.; REQUENA, T. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR ' s Garcı. v. 19, p. 405–409, 2009.

TAILLIEZ, P.; FURET, J.; QUE, P. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR ' ne. v. 97, p. 197–207, 2004.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K.; LATRILLE, E. . Yoghurt and other fermented milks. In: TAMIME, A.Y.; LAW, B.A., eds. Mechanisation and automation in dairy technology. **Mechanisation and automation in dairy technology. Sheffield: Sheffield Academic Press**, p. 152–203, 2001.

TERPOU, A. et al. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1591, 13 jul. 2019.

THERES, E. et al. ScienceDirect Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality c. v. 7, n. 0, 2014.

THUY, V. T. et al. Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs , fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Control**, v. 85, p. 472–483, 2018.

TRABELSI, I. et al. Incorporation of probiotic strain in raw minced beef meat: Study of textural modification, lipid and protein oxidation and color parameters during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 154, p. 29–36, 1 ago. 2019.

TUFARELLI, V.; LAUDADIO, V. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences AN OVERVIEW ON THE FUNCTIONAL FOOD CONCEPT : PROSPECTIVES AND APPLIED RESEARCHES IN PROBIOTICS , PREBIOTICS AND SYNBIOTICS Vincenzo Tufarelli * and Vito Laudadio. v. 4, n. 2320, 2016.

VALERIO, F.; DE BELLIS, P.; LONIGRO, S.L.; MORELLI, L.; VISCONTI, A.; LAVERMICOCCA, P. In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 3042–3045, 2006.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. v. 96, p. 149–164, 2004.

VIDOVIC, S.; MANGALAPPALLI-ILLATHU, A. K.; KORBER, D. R. Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of *rpoS*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 163–169, 30 mar. 2011.

VILLARREAL, M. et al. Advantageous Direct Quantification of Viable Closely

Related Probiotics in Petit-Suisse Cheeses under In Vitro Gastrointestinal Conditions by Propidium Monoazide - qPCR. v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

VLASOVA, A. N. et al. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species.

Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 172, p. 72–84, 1 abr. 2016.

WAN, M. L. Y.; FORSYTHE, S. J.; EL-NEZAMI, H. **Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges****Critical Reviews in Food Science and Nutrition**Taylor and Francis Inc., , 13 nov. 2019.

WANG, L. et al. Rapid and accurate detection of viable Escherichia coli O157 : H7 in milk using a combined IMS , sodium deoxycholate , PMA and real-time quantitative PCR process. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 119–125, 2014.

WEIGHARDT, F. uantitative PCR for the detection og GMOs, In: The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. **User manual. Ispra, Joint Research Centre**, 2006.

WILKINSON, M. G. **Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review****Trends in Food Science and Technology**Elsevier Ltd, , 1 ago. 2018.

WUYTS, S. et al. crossm Large-Scale Phylogenomics of the Lactobacillus casei Group Highlights Taxonomic Inconsistencies and Reveals. v. 2, n. 4, 2017.

YANG, X.; BADONI, M.; GILL, C. O. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable Escherichia coli from E . coli killed by mild or pasteurizing heat treatments. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1478–1482, 2011.

ZHAI, L. et al. Propidium monoazide real-time PCR amplification for viable salmonella species and salmonella heidelberg in pork. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 477–485, 2019.

ZHOU, P. et al. Rapid and quantitative detection of viable emetic *Bacillus cereus* by PMA-qPCR assay in milk. **Molecular and Cellular Probes**, v. 47, 1 out. 2019.

CAPÍTULO II
QUANTIFICATION OF *Lactobacillus paracasei* VIABLE CELLS IN
PROBIOTIC YOGHURT BY PROPIDIUM MONOAZIDE COMBINED WITH
QUANTITATIVE PCR

* Artigo aceito e publicado na Revista International Journal of Food Microbiology.
SCARIOT, M. C.; VENTURELLI, G. L.; PRUDÊNCIO, E. S.; ARISI, A. C. M.
Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium
monoazide combined with quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology,
v. 264, p. 1–7, 2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.021>

Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR

Mirella Crhistine Scariot, Gustavo Luiz Venturelli, Elane Schwinden Prudêncio, Ana Carolina Maisonnave Arisi*

*CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail address: ana.arisi@ufsc.br (A.C.M. Arisi).

ABSTRACT

Propidium monoazide (PMA) coupled with qPCR has been successfully used for specific quantification of viable bacteria cells in diverse matrices food. The present study aimed to develop PMA-qPCR assay for quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt. *L. paracasei* grown in culture medium was submitted to heat treatment at 60 °C for different periods of time and probiotic yoghurt containing *L. paracasei* were prepared and stored at 4 °C for 30 days. The viable cells were quantified using qPCR and PMA-qPCR assays targeting *tuf* gene and also by plate counting. Standard curves were prepared and mean efficiency obtained was 94% and 96% ($R^2 > 0.98$) to *L. paracasei* in culture medium and probiotic yoghurt stored one day, respectively. The limit of detection (LOD) for both samples was 104 genome copies, corresponding to 32.1 pg of DNA. For viable cells quantification, standard curves Cq versus log CFU were plotted using mean CFU by plate counting of *L. paracasei* grown in culture medium and probiotic yoghurt. Results obtained for *L. paracasei* heat-treated cells were concordant by PMA-qPCR and plate count, CFU decreased as the heat treatment time increased, while qPCR count remained constant. *L. paracasei* enumerations obtained by qPCR for probiotic yoghurt stored one day and 30 days were higher than enumerations by PMA-qPCR for the same samples. The plate count values were similar to CFU values obtained by PMA-qPCR. These results showed that PMA-qPCR is a powerful approach compared with culture-dependent methods for quantification of *L. paracasei* viable cells in yoghurt. PMA-qPCR allowed reliable obtained results much faster than plate counting.

Chemical compounds studied in this article: Propidium monoazide (PubChem CID: 3035529).

Keywords: Lactic acid bacteria. Quantitative PCR. Bacterial enumeration. Propidium monoazide. PMA-qPCR.

1. Introduction

Yoghurt or similar matrices food have been commonly used as vehicle for the incorporation of probiotic microorganisms, defined as “live microorganisms that when administrated in adequate amounts, confer health benefits to the host” (Hill et al., 2014). To exert these benefits, the concentration of live probiotic bacteria needs to be approximately 6 log CFU/mL at the time of product consumption (Roy, 2005). Lactic acid bacteria are commonly used as probiotic, and are often associated with food production and preservation, once they induce rapid acidification and improve sensory characteristics, such as taste and texture (Corbo et al., 2014; Leroy and De Vuyst, 2004; Mani-Lopez et al., 2014; Parolo et al., 2011). Species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the most used ones (Morales Villarreal et al., 2013), especially *Lactobacillus paracasei* (Alonso Buriti and Isay Saad, 2007; Chiang and Pan, 2012; Davis, 2014; Ilha et al., 2015; Patrignani et al., 2006; Vinderola et al., 2009).

Classical microbiological methods, also known as culture-dependent methods, are used to identify and quantify *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species in food. For *Bifidobacterium*, there are selective culture media based on mupirocin which facilitate their enumeration (Vlkova et al., 2015), however differentiation of *Lactobacillus* species requires considerable effort based on selective media and colony morphology (Kao et al., 2007). Specific enumeration of genetically close related species belonging *L. casei* group (*L. paracasei*, *L. casei* and *L. rhamnosus*) is compromised due to the similarity in growth requirements and morphology (Tabasco et al., 2007). Differentiation of these species is difficult (Bottari et al., 2017) and their nomenclature and classification are subjects of recent discussion (Wuyts et al., 2017).

Culture-independent DNA-based methods have been used as an alternative to classical methods, mainly qPCR has been widely used for specific bacterial species detection and quantification in diverse food matrices (Cocolin et al., 2013; Garcia-Cayuela et al., 2009; Kao et al., 2007; Podeur et al., 2015). However, the inability of differentiation between viable and non-viable cells remains an important inconvenience, since qPCR amplifies free DNA able to persist in the environment (Fittipaldi et al., 2012; Garcia-Cayuela et al., 2009; Juste et al., 2008; Morales Villarreal et al., 2013; Nocker et al., 2006). Nucleic acid intercalating dyes, such as propidium monoazide (PMA) coupled to qPCR has been proposed for viable cells detection in microbial communities and diverse matrices (Desfosses-Foucault et al., 2012; Ganesan et al., 2014; Garcia-Cayuela

et al., 2009; Morales Villarreal et al., 2013; Porcellato et al., 2015; Takahashi et al., 2017). PMA-qPCR detects cell viability based on membrane integrity (Nocker et al., 2006). PMA only penetrates membrane-damaged cells and it intercalates DNA. Subsequent visible light exposure leads to irreversible bind to DNA and PMA-conjugated DNA cannot be amplified by PCR. Consequently, DNA from membrane-intact cells is selectively detected by PMA-qPCR. This molecular method allows distinguishing between viable but non-culturable (VBNC) and dead microorganisms according to their membrane integrity (Elizaquivel et al., 2014; Seidel et al., 2017; Udomsil et al., 2016).

qPCR assay was developed to quantify *L. paracasei* in cheese targeting *tuf*, an elongation factor gene (Achilleos and Berthier, 2013). We demonstrated that this TUF assay can also be employed to quantify *L. paracasei* in yoghurt (Ilha et al., 2016), however PMA-qPCR has not yet been applied to quantify viable cells of *L. paracasei*. The present study aimed to develop PMA-qPCR assay for quantification of *L. paracasei* viable cells in probiotic yoghurt.

2. Material and methods

2.1 Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strain *L. paracasei* ATCC 10746 was acquired from the collection of André Tosello Foundation (Campinas, São Paulo, Brazil) and grown in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Merck, Darmstadt, Germany) at 30 °C until OD₆₀₀ 1.0. Other bacterial strains used as positive controls (*L. paracasei* FNU and *L. paracasei* LYO) and negative controls (*Lactobacillus casei* INCQS 500006, *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* spp., *Bacillus subtilis* ATCC 6051 and *Bacillus cereus* ATCC 14579) were grown as described previously (Ilha et al., 2016). The starter culture containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (YO-Flex L812, Chr. Hansen, Horsholm, Denmark) was prepared according to the manufacturer's protocol. Optical density (OD) of bacterial cell culture was measured at 600 nm using Hitachi U2910 Spectrophotometer (Tokyo, Japan).

2.2 Probiotic yoghurt preparation

L. paracasei ATCC 10746 grown in MRS broth (1 L) was centrifuged (1000 ×g, 20 min, 4 °C) and pellet was washed twice with 0.9% saline buffer, suspended in 200 mL UHT milk and stored at -20 °C. The plate count was carried out in MRS agar (Ilha et al., 2016). Pasteurized milk was heated at 85 °C for 5 min, cooled at 45 °C and the starter culture was added. The mixture was kept at 45 °C until reaching pH 4.6, followed by cooling to 4 °C and storage at 4 °C for 24 h in sterile glass bottles. The prepared yoghurt was divided in two: control yoghurt (without addition of *L. paracasei* ATCC 10746) and probiotic yoghurt (with addition of milk suspension containing *L. paracasei* ATCC 10746 in a final concentration of 8 log CFU/mL). The yoghurts were kept at 4 °C and sampling was performed at 1 and 30 days after inoculation of probiotic bacteria. Samples were used immediately for plate counting in MRS agar. Control and probiotic yoghurt samples (3 mL) were adjusted to pH 6.5 with 1 M NaOH, followed by addition of 1 M tri-sodium citrate (3 mL) and centrifuged (10,000 ×g, 10 min, 4 °C). Pellet was washed with 1.5% NaCl before PMA treatment (Garcia-Cayuella et al., 2009).

2.3 Heat treatment of *Lactobacillus paracasei* culture

L. paracasei ATCC 10746 was grown in 50 mL MRS broth at 37 °C until OD₆₀₀ 1.0, 1.5 mL of culture was placed in 24 microcentrifuge tubes, which were submerged in water bath at 60 °C (Fritzen-Freire et al., 2013) and three tubes were removed at each time (0, 5, 15, 30, 60 and 240 min after incubation). First tube was treated with PMA (PMA- treated cells), second tube was control (without PMA) and third tube was used to plate count in MRS agar. First and second tubes were submitted to centrifugation (6000 ×g, 2 min), pellets were washed twice with 0.9% NaCl before PMA treatment. Heat treatment was performed twice.

2.4 PMA treatment

Both heat-treated cells and yoghurt sample pellets were suspended in 500 µL ultra-pure water and then PMA treatment was performed. PMA (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) was dissolved (1 mg) in ultra- pure water according manufacturer instructions to obtain a stock concentration of 20 mM and stored at –20 °C in the dark. Aliquots of PMA solution was added to 500 µL heat-treated cells or yoghurt suspensions to obtain a final concentration of 50 µM PMA (Garcia-Cayuela et al., 2009). The tubes were incubated for 5 min in the dark (mixing to each 1 min), and then exposed for 15 min to a 500 W halogen light source. To prevent heating, the samples were placed on ice 20 cm from light source. Afterward the tubes were submitted to centrifugation (6000 ×g, 10 min) and pellets were stored at –80 °C until DNA extraction

2.5 DNA extraction

DNA was extracted from heat-treated cells, control yoghurt and probiotic yoghurt by DNAzol® method, as described by Achilleos and Berthier (2013) with modifications. Frozen pellets were cooled to room temperature and suspended in 1 mL of DNAzol® reagent (Life Technologies, CA, USA), 400 µL of isopropanol was added and tubes were submitted to centrifugation (6000 ×g, 6 min, 4 °C). Pellets were washed once with 500 µL of DNAzol® reagent, carefully homogenized and centrifuged at 6000 ×g, 6

min, 4 °C. After, pellets were washed twice with 1 mL of 75% ethanol and dried at room temperature. DNA was dissolved in 100 µL of ultra-pure water and 1 µL of RNase A (10 mg/mL) was added. This solution was incubated at 37 °C for 30 min and transferred to QIAshredder™ column (Qiagen, Hilden, Germany), submitted to centrifugation at 11,800 ×g for 2 min and the eluate was stored at -20 °C. DNA concentration was estimated from measurements at 260 and 280 nm on a Thermo Scientific NanoDrop 2000 spectrophotometer (Wilmington, DE, USA).

2.6 Real-time PCR quantification

TUF primer pair was used to amplify a fragment of 161 bp of the elongation factor Tu (*tuf*) gene (Achilleos and Berthier, 2013), forward and reverse primers were 5'-TCCGGGAAGCTGCTCAGC-3' and 5'-TGTT-TCACGAACAGGTG-3', respectively. Quantitative real-time PCR was performed in ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplification reactions were carried out in triplicate in a final volume of 25 µL containing 12.5 µL of 2× SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 350 nmol/L TUF Forward, 250 nmol/L TUF Reverse, water and 10 ng of template DNA. All reactions were carried out under the following cycling: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The fluorescence signal was measured at the end of each 60 °C step. Melting curve analysis was performed automatically by continuous heating from 65 °C to 95 °C. All real-time PCR runs were analyzed using automatic software settings.

2.7 Construction of standard curves

Standard curves (Cq versus log DNA copy number and Cq versus log CFU) were prepared with serial dilutions of genomic DNA isolated from *L. paracasei* ATCC 10746 pure culture grown until stationary growth phase and probiotic yoghurt (1 day after yoghurt preparation). Genomic DNA was 10-fold serially diluted in ultra-pure water to final copy number ranging from 10⁷ to 10⁰ genome copies per reaction, equivalent to 32.1 to 3.21 × 10⁻⁶ ng. The number of bacterial DNA copies was calculated on the basis of genome size (3.025 Mbp) of reference genome of the Human Microbiome Project, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 strain (GenBank GCA_000155515.2).

The corresponding CFU was calculated based on plate counting of the same sample. Amplification efficiencies were determined as described previously (Pereira et al., 2014).

2.8 *Lactobacillus paracasei* enumeration by qPCR and plate counting

Bacterial counts (CFU/mL) estimated by qPCR of *L. paracasei* ATCC 10746 grown in MRS broth and yoghurt samples collected at one day and 30 days after storage were calculated as described previously (Ilha et al., 2016). Enumeration of *L. paracasei* ATCC 10746 in yoghurt samples by plate counting was carried out in selective medium as described previously (Ilha et al., 2016).

3. RESULTS

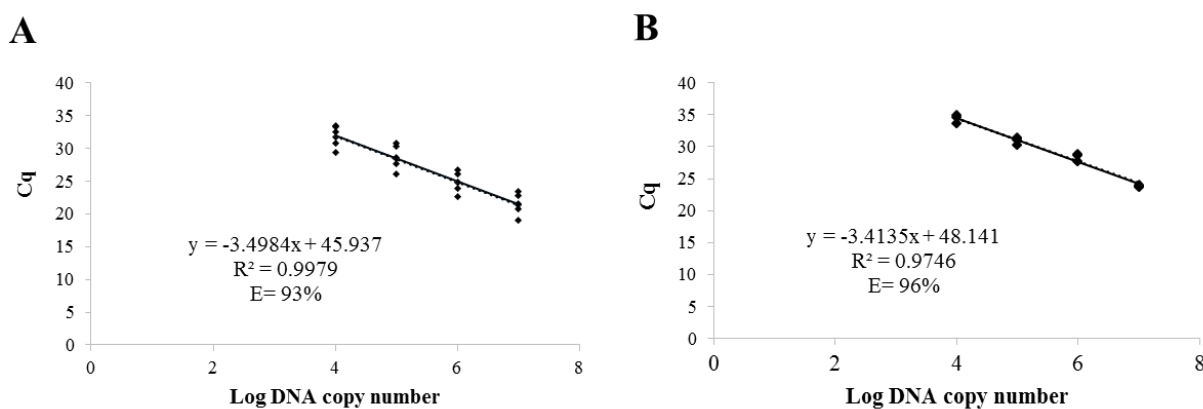
3.1 TUF qPCR parameters for *Lactobacillus paracasei* quantification

Four standard curves of TUF qPCR assay were prepared with serial dilution of genomic DNA isolated from *L. paracasei* ATCC 10746 pure culture using different primer concentrations. Efficiency value (E) of 98% and correlation coefficient (R^2) of 0.9988 were obtained using 350 and 250 nmol/L for TUF forward and reverse primers (Fig. S1). TUF qPCR assay parameters (efficiency, slope and correlation coefficient) were determined based on standard curves obtained from bacterial DNA isolated from pure culture of *L. paracasei* ATCC 10746 and from probiotic yoghurt sample, collected one day after preparation (Fig. 1). Six and three independent standard curves were carried out for *L. paracasei* grown in MRS broth and probiotic yoghurt sample, respectively (Table 1). The standard curves presented suitable linear correlation coefficient ($R^2 > 0.98$) and mean efficiency of 94% for pure culture *L. paracasei* and 96% for probiotic yoghurt sample. The limit of detection (LOD) for both samples was 10^4 genome copies, corresponding to 32.1 pg of DNA.

Table 1: TUF qPCR parameters of standard curves for *Lactobacillus paracasei* ATCC 10746 quantification. DNA was extracted from *L. paracasei* grown in medium culture and from probiotic yoghurt.

Run qPCR	<i>L. paracasei</i> culture			Probiotic yoghurt		
	Efficiency (%)	<i>Slope</i>	R^2	Efficiency (%)	<i>Slope</i>	R^2
1	88	-3.6372	0.9973	103	-3.2533	0.9953
2	97	-3.3841	0.9917	94	-3.4631	0.9821
3	96	-3.4344	0.9998	92	-3.5241	0.9835
4	86	-3.717	0.9996			
5	98	-3.3679	0.9993			
6	95	-3.4498	0.9993			
Mean	94	-3.50	0.998	96	-3.41	0.987

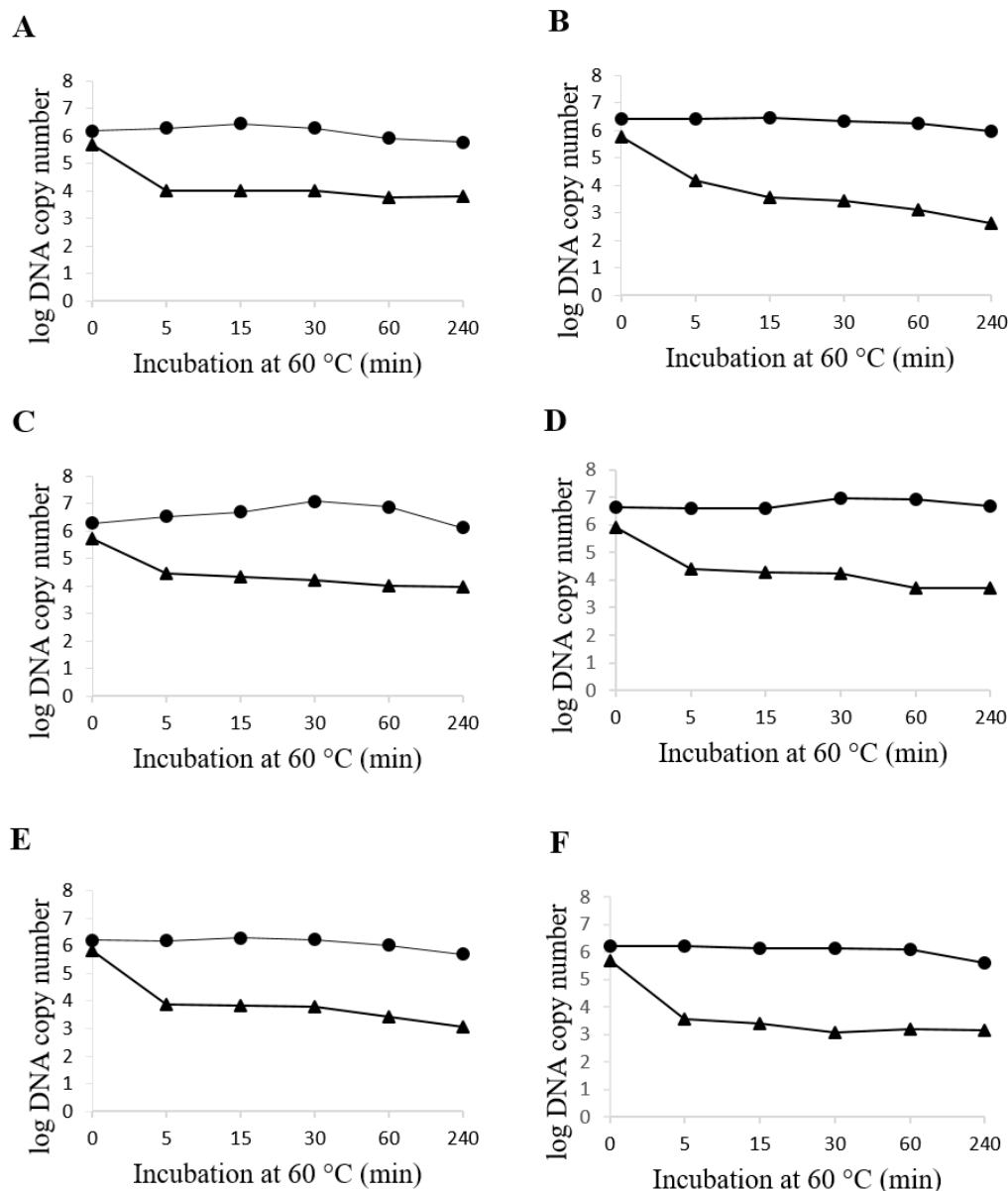
Figure 1: TUF qPCR assay standard curves (350 nmol/L TUFF and 250 nmol/L TUF R) for *L. paracasei* ATCC 10746 performed in six and three qPCR runs in different days using DNA extracted from (A) *L. paracasei* culture and (B) probiotic yoghurt.



3.2 PMA-treatment efficiency for viable cell quantification

In order to evaluate PMA treatment efficiency to inhibit DNA amplification of dead cells, aliquots of pure culture *L. paracasei* ATCC 10746 were submitted to heat treatment for different periods of time to obtain different amounts of viable and non-viable cells. *L. paracasei* were grown in MRS broth, submitted twice to heat treatment for zero to 240 min. Aliquots were treated or not with PMA, DNA were extracted and submitted to qPCR and PMA-qPCR, performed in three qPCR runs on different days. DNA copy number of each sample was calculated and compared among qPCR runs and DNA extracts (Fig. 2). In all cases, DNA copy number was reduced in PMA-treated samples when compared with samples without PMA. In addition, all samples without PMA presented similar DNA copy number, regardless of heat treatment performed. As expected, zero samples (with and without PMA) showed DNA copy number very close between them, because they were not submitted to heat treatment. Viable cell number decreased according to increasing heat treatment time in PMA-treated samples, i.e., DNA copy number was reduced from 5 minutes sample to 15 minutes sample and so on (Fig. 2).

Figure 2: Log DNA copy number of *L. paracasei* ATCC 10746 estimated by qPCR (circles) and PMA-qPCR (triangles). Cultures were submitted to heat treatment for different periods of time. A) qPCR run 1 and DNA extract 1; B) qPCR run 1 and DNA extract 2; C) qPCR run 2 and DNA extract 1; D) qPCR run 2 and DNA extract 2; E) qPCR run 3 and DNA extract 1; F) qPCR run 3 and DNA extract 2.



3.3 *Lactobacillus paracasei* viable cell quantification by PMA-qPCR

Viable cells of *L. paracasei* ATCC 10746 in heat-treated pure culture, as well as, in control yoghurt and in probiotic yoghurt samples were quantified by plate count, qPCR and qPCR coupled with PMA (PMA-qPCR). DNA was extracted in duplicate for each heat-treated culture sample using DNAzol[®] method and submitted to qPCR assay

(Table 2). Standard curves Cq versus log CFU were plotted using mean CFU by plate counting of *L. paracasei* (Fig. S2). The same was carried out for probiotic yoghurt samples (Fig. S3). Then, using the obtained Cq values and the equation described previously (Ilha et al., 2016), *L. paracasei* count (log CFU/mL) was calculated by qPCR and PMA-qPCR (Table 2 and Fig. 3). Average plate count of *L. paracasei* ATCC 10746 was 8.13 log CFU/mL for pure culture and 8.09 CFU/mL for probiotic yoghurt one day after probiotic bacteria inoculation. Regarding heat-treatment, observed Cq values with and without PMA were close for samples collected at zero minutes and all other samples presented Cq values higher for PMA-treated samples than samples without PMA (Table S1). Furthermore, differences between Cq values obtained by qPCR and PMA-qPCR increased according to incubation period of time at 60 °C (Table S1). Yoghurt control sample collected at one day did not present amplification signal in qPCR and PMA-qPCR assay, Cq values for probiotic yoghurt were in the range of standard curves, from 21.16 to 38.46 (Table S2). Enumeration of *L. paracasei* ATCC 10746 of heat-treated samples (Table 2) and probiotic yoghurt samples (Fig. S4) by qPCR showed values (log CFU/mL) higher than enumeration by PMA-qPCR and plate count. Similar counts by PMA-qPCR and plate count method were obtained for all samples. qPCR enumeration showed values of 8.62 ± 0.19 log CFU/mL probiotic yoghurt 1 day after storage and 9.67 ± 0.08 log CFU/mL for probiotic yoghurt 30 days after storage, while the enumeration by PMA-qPCR presented values of 7.15 ± 0.18 and 8.47 ± 0.18 log CFU/mL for the same samples, respectively. The plate count values were similar to CFU values obtained by PMA-qPCR: 7.31 ± 0.16 log CFU/mL and 8.41 ± 0.28 log CFU/mL for probiotic yoghurt 1 and 30 days after storage (Fig. 3).

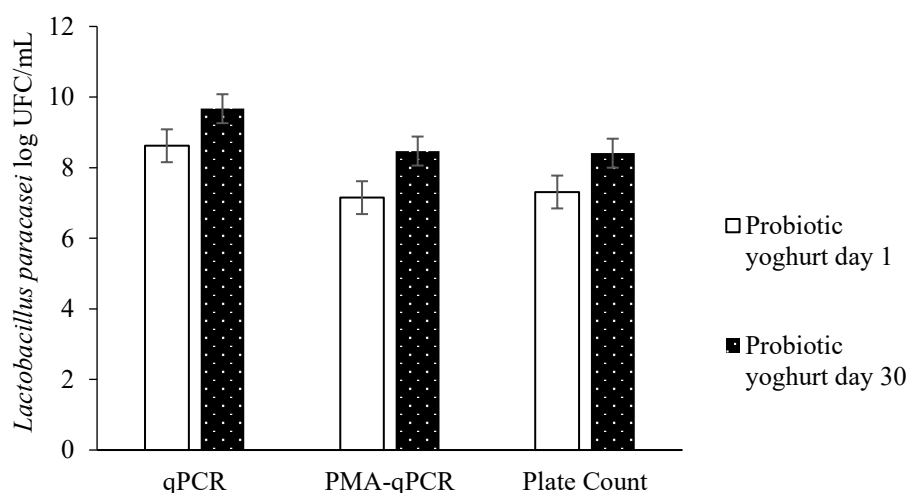
Table 2: Comparison of *L. paracasei* ATCC10746 count (log CFU/mL) obtained by qPCR, PMA- qPCR and plate count of heat-treated culture samples.

Sample	qPCR ^a count (log UFC/mL)	PMA-qPCR ^a count (log UFC/mL)	Plate count ^b (log UFC/mL)
0'	7.57 ± 0.21	7.33 ± 0.58	7.34 ± 0.52
5'	7.51 ± 0.16	5.20 ± 0.41	5.63 ± 0.27
15'	7.59 ± 0.30	5.12 ± 0.46	5.19 ± 0.16
30'	7.44 ± 0.60	4.76 ± 0.83	4.78 ± 0.21
60'	7.29 ± 0.64	4.69 ± 0.57	4.74 ± 0.14
240'	7.07 ± 0.61	4.89 ± 0.53	4.46 ± 0.34

^a Values are mean ± SD (n = 12), qPCR duplicate of two independent DNA extracts in three independent runs.

^b Values are mean ± SD (n = 3), triplicate plate count.

Figure 3: Comparison of *Lactobacillus paracasei* ATCC 10746 count (log CFU/mL) obtained by qPCR, PMA-qPCR and plate count of probiotic yoghurt samples collected at 1 and 30 day. Each bar represents the mean ± SD (n = 9) values.



4. Discussion

PMA-qPCR has been successfully used to quantify viable cells of microorganisms associated with different food samples, such as *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables (Elizaquível et al., 2012); *Escherichia coli* O157:H7 in milk (Wang et al., 2014) and *Bacillus cereus* in baby cereal, pasteurized milk and rice (Forghani et al., 2015). Especially, this molecular approach has been proposed to quantify lactic acid bacteria in food samples like *L. bulgaricus* (Shao et al., 2016), *L. gasseri* (Oketic et al., 2015), *Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei* and *L. acidophilus* (Garcia-

Cayuela et al., 2009). In our work, viable cells of *L. paracasei* ATCC 10746 from heat-treated culture medium and yoghurt were quantified by plate count, qPCR and PMA-qPCR.

The quantification of microorganisms by qPCR using Cq value and standard curve should consider the influence of matrix (Rizzotti et al., 2015), so it requires standard curves using DNA extracted from target microorganisms in the relevant physiological state and/or relevant food matrix (Ceuppens et al., 2010). In our work, standard curves were performed with *L. paracasei* DNA isolated from pure culture and also from probiotic yoghurt. The standard curves presented suitable reaction parameters, with efficiencies ranging from 88% to 103% and R^2 value higher than 0.98, for both pure culture and yoghurt, these values were comparable to qPCR assays developed to quantify other bacteria (Cattani et al., 2016; Lv et al., 2016; Xiao et al., 2015). A reliable standard curve should present a R^2 value higher than 0.95 and a slope between -3.9 and -3.0 , corresponding to PCR efficiencies between 80 and 115%, respectively (Zhang and Fang, 2006). The efficiency values ranged from 81.1% to 99.5% when TUF qPCR assay was developed for *L. paracasei* quantification in cheese (Achilleos and Berthier, 2013). We observed similar TUF qPCR parameters (Ilha et al., 2016) for *L. paracasei* FNU quantification in probiotic yoghurt, with efficiency values of 95% for pure *L. paracasei* FNU strain and 103% for probiotic yoghurt. However, these previous works did not employ TUF qPCR assay coupled to PMA in order to quantify viable cell. The specificity TUF primer was previously reported (Achilleos and Berthier, 2013).

To our knowledge the use of TUF primer to quantify *L. paracasei* after PMA treatment has not been established yet. To verify the efficiency of PMA dye to inhibit DNA amplification of dead cells, cells were submitted to heat treatment and mixtures of viable and non-viable cells were treated with PMA before qPCR (Shao et al., 2016; Yang et al., 2011). We evaluated PMA dye performance using DNA extracted from heat-treated pure culture of *L. paracasei* ATCC 10746 collected in different periods of time. Similar approach was employed to quantify *E. coli* viable cells (Takahashi et al., 2017). In their study, PMA dye was able to differentiate between viable and non-viable cells, since differences were observed between CFU counts obtained by qPCR and PMA-qPCR for same samples. Observed differences show that qPCR assay detected total DNA, while PMA-qPCR detected DNA from intact membrane cells (Takahashi et al., 2017; Truchado et al., 2016). In heat-treated samples, *L. paracasei* counts by qPCR kept in 7 log CFU/mL

for all samples, while counts by PMA-qPCR and plate count were similar and reduced from 7 to 4.5 log CFU/mL according to increase heat treatment (Table 2). Here in single treatment with 50 μ M PMA and 15 min exposure to light was effective for viable cell count by PMA-qPCR. *L. paracasei* enumeration of probiotic yoghurt one day after bacteria inoculation showed reduction of 1 log CFU/mL when compared to inoculation of probiotic bacteria (8 log CFU/mL). Lastly, at 30 days (expiration date) counts were 8 log CFU/mL approximately, showing to be sufficient to offer a health benefit as probiotic yoghurt (Roy, 2005). In mixed culture cheese, all probiotic strains remained at 9 log CFU/g, a sufficient count to exert the effects as probiotic product (Desfosses- Foucault et al., 2012). Control yoghurt was not quantified because there was no amplification signal in qPCR and PMA-qPCR assay and there was no growth in selective culture medium. We observed similar results (Ilha et al., 2016) to control yoghurt samples collected at 1, 7, 14, 21 and 28 days. These results showed that there was no contamination between control and probiotic yoghurt samples, which could generate false positive signals and equivocal quantification of probiotic bacteria.

PMA coupled with qPCR is a powerful approach compared with culture-dependent methods for quantification of viable cells (Tantikachornkiat et al., 2016), especially for lactic acid bacteria enumeration (Ramirez et al., 2017). The main advantages of PMA-qPCR are that it allows easy, simple and more precise quantification, with less waste production. PMA-qPCR assay has already been proposed to quantify probiotics in yoghurt samples (Garcia-Cayuela et al., 2009), but to our knowledge, PMA-qPCR assay for *Lactobacillus paracasei* viable cells quantification has not been described to date. In conclusion, our results showed that this molecular approach allowed estimation of *L. paracasei* viable cell amounts associated with probiotic yoghurt.

Acknowledgments

This work was financially supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (304666/2015-7, Ministry of Science and Technology, Brazil. Mirella C. Scariot and Gustavo L. Venturelli are recipients of PhD fellowships from Coordination of Personnel Improvement of Higher Education (CAPES), Ministry of Education, Brazil and Ana Carolina M. Arisi and Elane S. Prudêncio are recipients of research fellowship (PQ2) from CNPq. We would like to express our

gratitude to Silvani Verruck for yoghurt preparation assistance and Helena de Oliveira Santeli for technical support.

Conflicts of interest

None.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.021>.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1: C_q and T_m obtained by qPCR assay using DNA extracted from heat-treated samples.

Sample without PMA-treatment	C_q	T_m	Sample with PMA-treatment	C_q	T_m
0' 1	25.01	77.72	0' 1	25.02	78.90
	25.24	77.55		25.33	77.91
	22.38	78.34		25.57	78.88
	24.91	78.57		25.63	78.75
	23.82	78.79		24.59	78.97
	23.72	78.47		23.16	78.83
0' 2	24.58	77.90	0' 2	24.98	78.75
	24.60	77.91		25.14	77.55
	22.02	78.70		25.89	78.52
	23.56	78.75		23.29	78.57
	22.62	78.65		22.27	78.54
	24.00	78.33		23.73	78.47
5' 1	25.64	77.90	5' 1	33.90	78.09
	25.72	77.91		31.29	78.09
	22.50	78.70		31.22	78.88
	23.46	78.57		31.98	78.93
	22.24	78.79		30.01	78.97
	23.70	78.83		30.95	79.01
5' 2	24.87	78.09	5' 2	33.39	77.72
	24.96	77.90		31.31	77.91
	22.38	78.88		31.63	78.88
	23.48	78.93		31.32	78.57
	22.37	78.97		30.41	78.73
	23.82	78.01		32.61	78.59
15' 1	25.78	77.90	15' 1	ND	62.01
	25.62	77.73		32.4	78.99
	22.87	78.34		31.5	78.83
	22.20	78.75		30.45	78.93
	21.16	78.79		29.70	78.97
	22.56	78.65		30.86	79.01
15' 2	23.92	78.09	15' 2	ND	62.02
	24.28	77.91		32.74	78.99
	21.65	78.88		31.65	78.56
	23.88	78.75		33.98	78.39
	23.13	78.97		29.70	78.09
	24.85	78.83		33.69	78.65
30' 1	25.46	77.72	30' 1	32.34	77.90

	21.73	78.45		30.2	78.81
	21.79	78.52		35.93	78.88
	23.75	78.93		33.45	78.93
	22.60	78.62		32.65	78.97
	24.14	78.65		33.64	78.52
	25.39	77.90		35.35	77.72
	22.58	78.63		31.09	78.79
30' 2	22.67	78.70	30' 2	33.24	78.88
	23.56	78.75		34.78	78.75
	22.53	78.79		ND	61.78
	23.89	78.65		34.55	78.83
	27.96	77.53		34.49	77.72
	23.35	78.45		31.26	78.63
60' 1	23.41	78.52	60' 1	32.58	78.70
	23.80	78.39		33.09	78.75
	22.30	78.62		33.08	78.79
	23.94	78.47		32.71	78.83
	25.22	77.72		38.46	77.34
	22.22	78.63		33.01	78.63
60' 2	22.48	78.52	60' 2	33.63	78.16
	24.29	78.57		34.13	78.57
	23.05	78.62		33.24	78.44
	24.54	78.65		33.3	78.47
	27.74	77.34		33.43	77.72
	23.52	78.27		32.24	78.63
240' 1	23.65	78.34	240' 1	33.13	78.52
	25.08	78.20		33.97	78.39
	27.70	78.27		32.38	78.44
	25.87	78.10		34.52	78.65
	26.69	77.53		33.54	77.34
	23.33	78.27		32.24	78.09
240' 2	23.60	78.34	240' 2	33.54	78.12
	24.77	78.39		34.13	78.63
	23.80	78.44		34.68	78.72
	26.75	78.47		33.98	78.42

Table S2: Cq and Tm obtained by qPCR assay using DNA extracted from control and probiotic yoghurt sample.

Sample without PMA-treatment	Cq	Tm	Sample with PMA-treatment	Cq	Tm
	nd	-		nd	-
	nd	-		nd	-
	nd	-		nd	-
	nd	-		nd	-
Control yoghurt	nd	-	Control yoghurt	nd	-
	nd	-		nd	-
	nd	-		nd	-
	nd	-		nd	-
	nd	-		nd	-
	25.25	78.99		30.31	78.99
	24.83	78.99		32.27	78.80
	25.24	78.99		31.37	78.44
Probiotic yoghurt day 1	25.37	78.90	Probiotic yoghurt day 1	31.80	78.99
	25.77	78.89		32.81	78.89
	25.77	78.92		31.92	78.52
	24.55	78.99		28.80	78.89
	24.66	78.90		30.60	78.70
	24.45	78.92		31.23	78.52
	25.97	78.62		25.31	78.99
	24.80	78.62		25.30	78.99
	24.98	78.80		25.57	78.80
	24.92	78.79		25.75	78.89
Probiotic yoghurt day 30	24.92	78.82	Probiotic yoghurt day 30	25.15	78.99
	24.68	78.89		25.86	78.89
	24.04	78.70		24.69	78.89
	24.04	78.70		24.76	78.89
	23.76	78.89		24.80	78.89

nd – not detected.

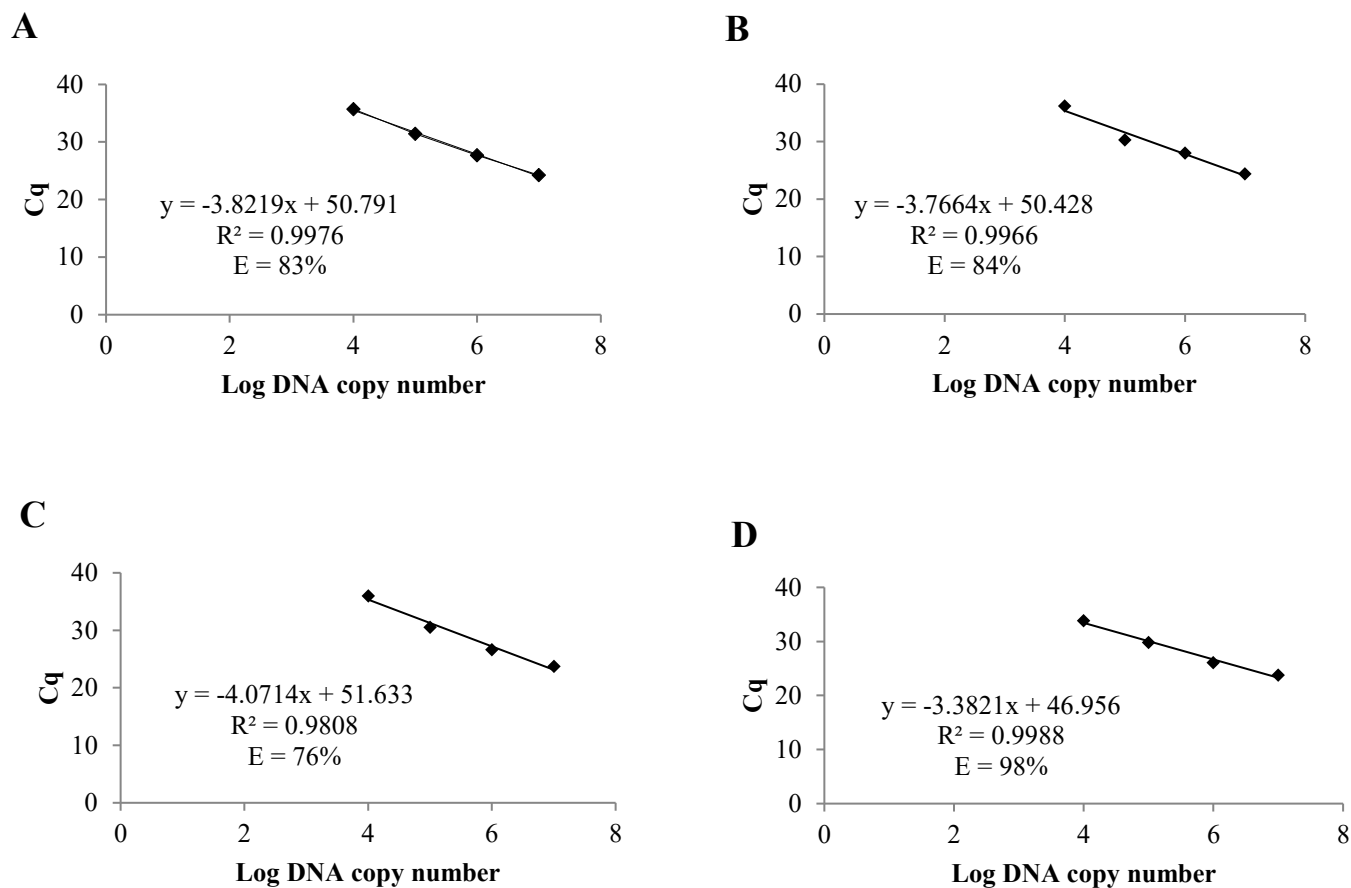


Figure S1: qPCR standard curves using DNA extracted from *L. paracasei* ATCC 10746 grown in culture medium as template DNA and TUF primer pairs. (a) 300 nmol/L TUFF and 150 nmol/L TUFR; (b) 300 nmol/L TUFF and 200 nmol/L TUFR; (c) 350 nmol/L TUFF and 200 nmol/L TUFR; (d) 350 nmol/L TUFF and 250 nmol/L TUFR.

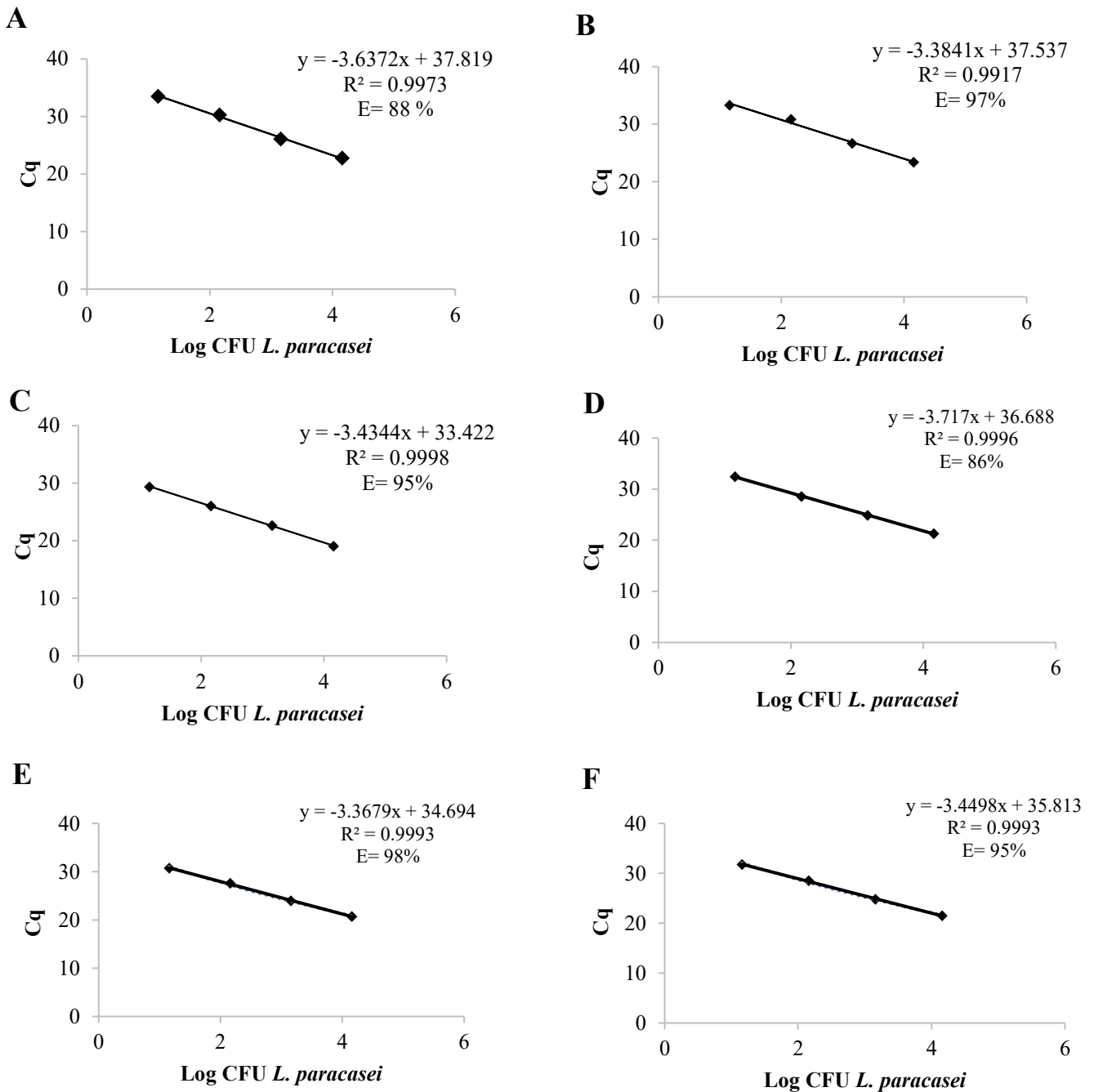


Figure S2: TUF qPCR standard curves for *L. paracasei* ATCC 10746 performed in six different days using DNA extracted from medium culture as template DNA. Cq versus log CFU used for *L. paracasei* quantification of heat-treated samples.

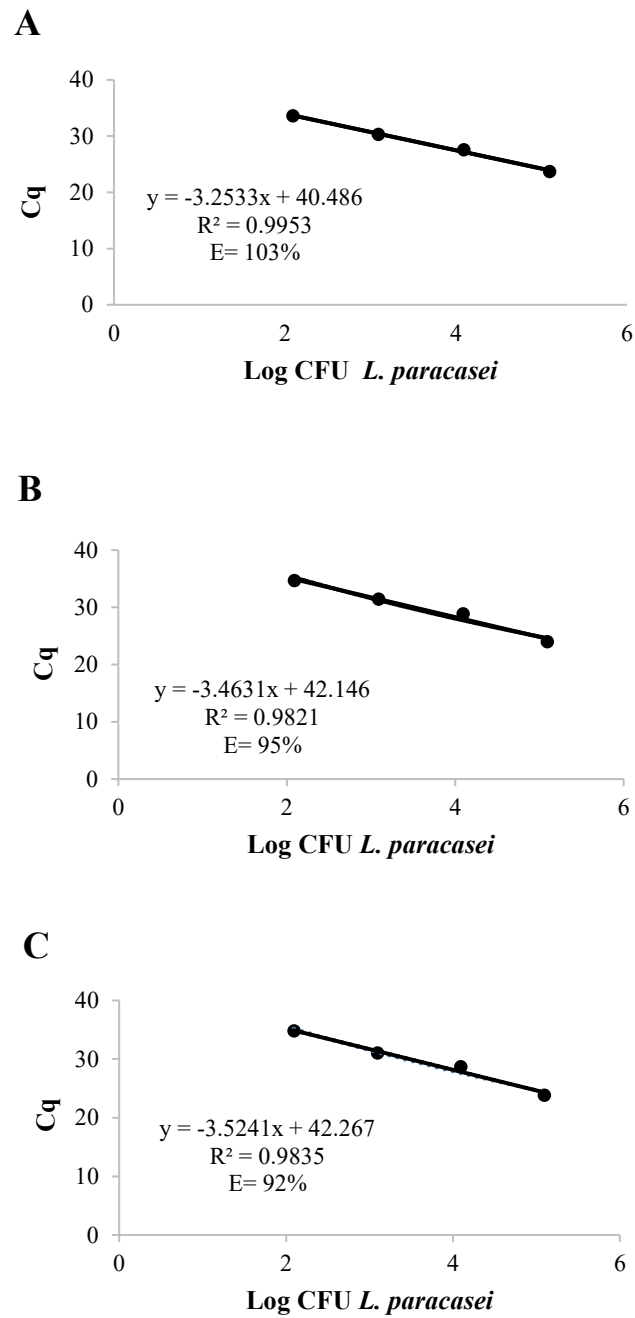


Figure S3: TUF qPCR standard curves for *L. paracasei* ATCC 10746 performed in three different days and using DNA extracted from probiotic yoghurt as template DNA. Cq versus log CFU used for control and probiotic yoghurt quantification.

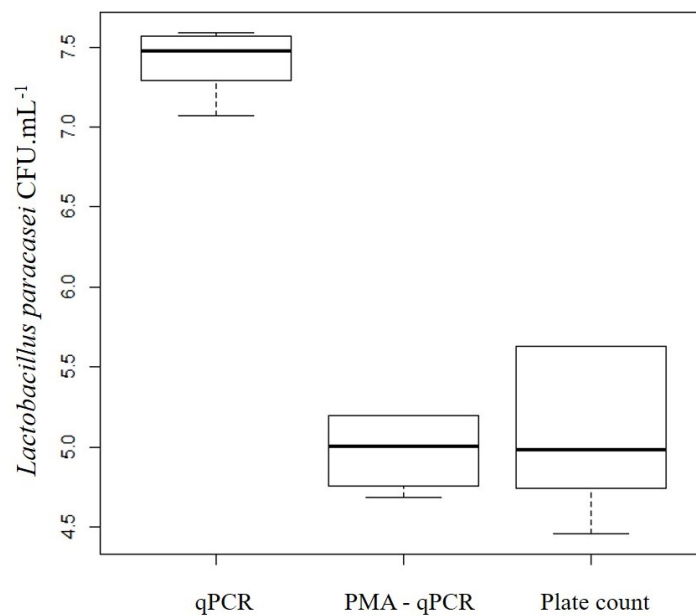


Figure S4: *Lactobacillus paracasei* ATCC 10746 counts (log CFU/mL) obtained by qPCR, PMA-qPCR and plate count of heat-treated culture samples. Boxplot represents qPCR triplicates of two independent DNA extracts in two independent runs and triplicate plate count. The line inside the box represents the median value, while the bottom and the top of the boxes represent the quartiles (25% and 75%).

REFERENCES

- Achilleos, C., Berthier, F., 2013. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food Microbiology* 36, 286-295.
- Alonso Buriti, F.C., Isay Saad, S.M., 2007. Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* 57, 373-380.
- Bottari, B., Felis, G.E., Salvetti, E., Castioni, A., Campedelli, I., Torriani, S., Bernini, V., Gatti, M., 2017. Effective identification of *Lactobacillus casei* group species: genome-based selection of the gene *mutL* as the target of a novel multiplex PCR assay. *Microbiology* 163, 950-960.
- Cattani, F., Barth, V.C., Nasario, J.S.R., Ferreira, C.A.S., Oliveira, S.D., 2016. Detection and quantification of viable *Bacillus cereus* group species in milk by propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Journal of Dairy Science* 99, 2617-2624.
- Ceuppens, S., Boon, N., Rajkovic, A., Heyndrickx, M., Van de Wiele, T., Uyttendaele, M., 2010. Quantification methods for *Bacillus cereus* vegetative cells and spores in the gastrointestinal environment. *Journal of Microbiological Methods* 83, 202-210.
- Chiang, S.-S., Pan, T.-M., 2012. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NTU 101 and its fermented products, *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 903-916.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., Rantsiou, K., 2013. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 167, 29-43.
- Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., Speranza, B., Sinigaglia, M., 2014. Selection of promising lactic acid bacteria as starter cultures for sourdough: using a step-by-step approach through quantitative analyses and statistics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 1772-1780.
- Davis, C., 2014. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 103, 9-17.
- Desfosses-Foucault, E., Dussault-Lepage, V., Le Boucher, C., Savard, P., La Pointe, G., Roy, D., 2012. Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. *Frontiers in Microbiology*.
- Elizaquivel, P., Aznar, R., Sanchez, G., 2014. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology* 116, 1-13.

Elizaquível, P., Sánchez, G., Aznar, R., 2012. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control* 25, 704-708.

Fittipaldi, M., Nocker, A., Codony, F., 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods* 91, 276-289.

Forghani, F., Langae, T., Eskandari, M., Seo, K.-H., Chung, M.-J., Oh, D.-H., 2015. Rapid detection of viable *Bacillus cereus* emetic and enterotoxic strains in food by coupling propidium monoazide and multiplex PCR (PMA-mPCR). *Food Control* 55, 151-157.

Fritzen-Freire, C.B., Prudêncio, E.S., Pinto, S.S., Muñoz, I.B., Amboni, R.D.M.C., 2013. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology* 50, 39-44.

Ganesan, B., Weimer, B.C., Pinzon, J., Kong, N.D., Rompato, G., Brothersen, C., McMahon, D.J., 2014. Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 116, 1642-1656.

Garcia-Cayuela, T., Tabasco, R., Pelaez, C., Requena, T., 2009. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. *International Dairy Journal* 19, 405-409.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11, 506-514.

Ilha, E.C., da Silva, T., Lorenz, J.G., de Oliveira Rocha, G., Sant'Anna, E.S., 2015. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *European Food Research and Technology* 240, 977-984.

Ilha, E.C., Scariot, M.C., Treml, D., Pereira, T.P., Sant'Anna, E.S., Prudncio, E.S., Arisi, A.C.M., 2016. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. *Annals of Microbiology* 66, 597-606.

Juste, A., Thomma, B.P.H.J., Lievens, B., 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25, 745-761.

- Kao, Y.-T., Liu, Y.-S., Shyu, Y.-T., 2007. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International* 40, 71-79.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67-78.
- Lv, X.-C., Li, Y., Qiu, W.-W., Wu, X.-Q., Xu, B.-X., Liang, Y.-T., Liu, B., Chen, S.-J., Rao, P.-F., Ni, L., 2016. Development of propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR (PMA-qPCR) assays to quantify viable dominant microorganisms responsible for the traditional brewing of Hong Qu glutinous rice wine. *Food Control* 66, 69-78.
- Mani-Lopez, E., Palou, E., Lopez-Malo, A., 2014. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 97, 2578-2590.
- Morales Villarreal, M.L., Padilha, M., Silva Vieira, A.D., Gombossy de Melo Franco, B.D., Ruiz Martinez, R.C., Isay Saad, S.M., 2013. Advantageous Direct Quantification of Viable Closely Related Probiotics in Petit-Suisse Cheeses under In Vitro Gastrointestinal Conditions by Propidium Monoazide - qPCR. *Plos One* 8.
- Nocker, A., Cheung, C.-Y., Camper, A.K., 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods* 67, 310-320.
- Oketic, K., Matijasic, B.B., Obermajer, T., Radulovic, Z., Levic, S., Mirkovic, N., Nedovic, V., 2015. Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for enumeration of probiotic lactobacilli microencapsulated in calcium alginate beads. *Benef Microbes* 6, 573-581.
- Parolo, C.C.F., Do, T., Henssge, U., Alves, L.S., de Santana Giongo, F.C.M., Corcao, G., Maltz, M., Beighton, D., 2011. Genetic diversity of *Lactobacillus paracasei* isolated from in situ human oral biofilms. *Journal of Applied Microbiology* 111, 105-113.
- Patrignani, F., Lanciotti, R., Mathara, J.M., Guerzoni, M.E., Holzapfel, W.H., 2006. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *International Journal of Food Microbiology* 107, 1-11.
- Pereira, T.P., do Amaral, F.P., Dall'Asta, P., Angonesi Brod, F.C., Maisonnave Arisi, A.C., 2014. Real-Time PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots. *Molecular Biotechnology* 56, 660-670.
- Podeur, G., Dalgaard, P., Leroi, F., Prevost, H., Ernborg, J., Martinussen, J., Hansen, L.H., Filet, M.F., 2015. Development of a real-time PCR method coupled with a selective pre-enrichment step for quantification of *Morganella morganii* and *Morganella psychrotolerans* in fish products. *International Journal of Food Microbiology* 203, 55-62.

- Porcellato, D., Magri, M., Narvhus, J., 2015. Viable cells differentiation improves microbial dynamics study of fermented milks. *International Dairy Journal* 47, 136-142.
- Ramirez, M.D.F., Kostopoulos, I., Smid, E.J., Groot, M.N.N., Abee, T., 2017. Quantitative assessment of viable cells of *Lactobacillus plantarum* strains in single, dual and multi-strain biofilms. *International Journal of Food Microbiology* 244, 43-51.
- Rizzotti, L., Levav, N., Fracchetti, F., Felis, G.E., Torriani, S., 2015. Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control* 47, 407-412.
- Roy, D., 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait* 85, 39-56.
- Seidel, L., Strathmann, M., Nocker, A., 2017. The feasibility of improved live-dead distinction in qPCR-based microbial source tracking. *Journal of Microbiological Methods* 140, 23-31.
- Shao, Y.Y., Wang, Z.X., Bao, Q.H., Zhang, H.P., 2016. Application of propidium monoazide quantitative real-time PCR to quantify the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science* 99, 9570-9580.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Pelaez, C., Requena, T., 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *L-acidophilus*, *L-paracasei* subsp *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* 17, 1107-1114.
- Takahashi, H., Gao, Y., Miya, S., Kuda, T., Kimura, B., 2017. Discrimination of live and dead cells of *Escherichia coli* using propidium monoazide after sodium dodecyl sulfate treatment. *Food Control* 71, 79-82.
- Tantikachornkiat, M., Sakakibara, S., Neuner, M., Durall, D.M., 2016. The use of propidium monoazide in conjunction with qPCR and Illumina sequencing to identify and quantify live yeasts and bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 234, 53-59.
- Truchado, P., Gil, M.I., Kostic, T., Allende, A., 2016. Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production. *Food Control* 62, 150-156.
- Udomsil, N., Chen, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J., 2016. Quantification of viable bacterial starter cultures of *Virgibacillus* sp and *Tetragenococcus halophilus* in fish sauce fermentation by real-time quantitative PCR. *Food Microbiology* 57, 54-62.
- Vinderola, G., Prosello, W., Molinari, F., Ghiberto, D., Reinheimer, J., 2009. Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology* 135, 171-174.

Vlkova, E., Salmonova, H., Bunesova, V., Geigerova, M., Rada, V., Musilova, S., 2015. A new medium containing mupirocin, acetic acid, and norfloxacin for the selective cultivation of bifidobacteria. *Anaerobe* 34, 27-33.

Wang, L., Li, P., Zhang, Z., Chen, Q., Aguilar, Z.P., Xu, H., Yang, L., Xu, F., Lai, W., Xiong, Y., Wei, H., 2014. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process. *Food Control* 36, 119-125.

Wuyts, S., Wittouck, S., De Boeck, I., Allonsius, C.N., Pasolli, E., Segata, N., Lebeer, S., 2017. Large-Scale Phylogenomics of the *Lactobacillus casei* Group Highlights Taxonomic Inconsistencies and Reveals Novel Clade-Associated Features. *mSystems* 2.

Xiao, L., Zhang, Z., Sun, X., Pan, Y., Zhao, Y., 2015. Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment. *Food Control* 57, 185-189.

Yang, X., Badoni, M., Gill, C.O., 2011. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. *Food Microbiology* 28, 1478-1482.

Zhang, T., Fang, H.H.P., 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 281-289.

CAPÍTULO III

Lactobacillus paracasei AS BIO-CONTROL AGENT AGAINST FOODBORNE PATHOGENS IN ARTISANAL PROBIOTIC YOGHURT

* Artigo submetido para revista *International Journal of Food Microbiology* em 2020.
SCARIOT, M. C.; ARISI, A. C. M; UYTENDAELE, M. *Lactobacillus paracasei* as
bio-control agent against foodborne pathogens in artisanal probiotic yoghurt.

***Lactobacillus paracasei* as bio-control agent against foodborne pathogens in artisanal probiotic yoghurt**

Mirella Crhistine Scariot^{1,2}, Ana Carolina Maisonnave Arisi², Mieke Uyttendaele^{1*}

¹ *Research unit Food Microbiology and Food Preservation, Department of Food Technology, Food Safety and Health, Faculty of Bio-science Engineering, Ghent University, Coupure Links 653, 9000 Ghent, Belgium.*

² *CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001, Florianopolis, SC, Brazil.*

*Corresponding author

Email address: mieke.uyttendaele@ugent.be

1. Introduction

Fermentation is known as a natural biological process which prepares and preserves raw foods by extending their shelf life as well as improving sensory characteristics such as taste and texture (Oliveira et al., 2018). Frequently, fermented products like yoghurt are considered safe. They have low pH and this feature does not favor the growth of many foodborne pathogenic bacteria (Cutrim et al., 2016; Kamal et al., 2018). Despite this, many studies have reported the survival of pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and pathogenic Shiga-toxin producing *E. coli* in diverse food matrices, especially fermented dairy products (Ahmed and Shimamoto, 2014; Bachrouri et al., 2006; Kamal et al., 2018; Nikodinoska et al., 2019; Oliveira et al., 2018; Rivera-reyes et al., 2019; Verraes et al., 2015). Besides that, the production of fermented dairy products on a family scale starting from raw milk have deep roots in many countries worldwide. The absence of a standardized thermal process for the raw milk pose a danger to pathogen proliferation (Kamal et al., 2018; Verraes et al., 2015). Therefore, the presence of pathogenic bacteria may pose a public health risk as well as an obstacle to the sale or exportation of these products with the consequent economic damage (Gillespie et al., 2006). In this sense, it is a search for preventive measures that minimize the risk of contamination and prevent the outgrowth of foodborne pathogen bacteria. Among these strategies, the use of biocontrol agents such as lactic acid bacteria (LAB) and their extracellular compounds has been proposed. Diverse studies have demonstrated that these microorganisms have antimicrobial properties against the main foodborne pathogen bacteria without toxic effect on human health or changes in the sensory characteristics of food matrices (Bharti, V., A. Mehta, S. Singh, N. Jain, L. Ahirwal, 2015; Jesus et al., 2016; Kamal et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Vermeiren et al., 2004).

Besides that, some lactic acid bacteria has been recognized as probiotics, defined as “live microorganisms that when administrated in adequate amounts, confer health benefits to the host” (Hill et al., 2015). Recently, the incorporation of probiotic bacteria into food products has become a growing trend, once that consumers have been looking for products that offer more health benefits (Ashraf and Shah, 2011; Ilha et al., 2015).

Yoghurt is commonly used as vehicle for the incorporation of probiotic bacteria since it provide a good environment for the growth and proliferation of the bacteria (Castele et al., 2006; Ilha et al., 2015; Kamal et al., 2018; Scariot et al., 2018; Song et al., 2012). It is made from the symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Probiotic bacteria can be added together with starter cultures at the beginning of the fermentation process or separately after the process (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001).

Lactobacillus paracasei has been well documented as a probiotic microorganism and antimicrobial agent and for its technological properties has been widely used in different food matrices (Atanassova et al., 2003; Bendali et al., 2011; Bendjeddou et al., 2012; Carolina et al., 2007; Chiang, S.; Pan, 2012; Ilha et al., 2015; Patrignani, 2006). Some authors demonstrated that *Lact. paracasei* strains are able to tolerate different pH and temperature and high concentrations of salt, showing that this specie present suitable technological properties for food industry (Chiang, S.; Pan, 2012; Patrignani, 2006). Moreover, they induce rapid acidification and improve sensory characteristics such taste and texture (Corbo et al., 2014; De Vuyst and Leroy, 2007; Ho et al., 2018; Parolo et al., 2011).

Diverse studies demonstrated separately that some *Lact. paracasei* strains present probiotic and antimicrobial properties. However, to our knowledge, there is no information on the use of the *Lact. paracasei* as a probiotic and biocontrol agent simultaneously. This study aimed to investigate the survival and tolerance of lactic acid bacteria and pathogens under different conditions and then, to evaluate the ability to use of *Lact. paracasei* as a probiotic and biocontrol agent against the main foodborne pathogens in artisanal yoghurt.

2. Material and Methods

2.1 Bacterial strains and culture conditions

Five lactic acid bacteria including the traditional yoghurt fermenting strains *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as well as three *Lactobacillus* strains (*Lactobacillus sakei* and two *Lactobacillus paracasei* strains) and twenty foodborne pathogens strains including several strains of *L. monocytogenes*, *Salmonella* and *E. coli* O157 and indicator strains such as of generic *E. coli*, *L. innocua* and *Enterococcus faecium* were used in this study (Table 1). The pathogens' strains were available from the culture collection of the Food Microbiology and Food Preservation research unit of Ghent University, some of them own isolates, others are also part of standard culture collections and can be retrieved from ATCC (Gaithersburg, Maryland) or BCCM/LMG (Ghent, Belgium) Bacteria collection.

A reference stock of each strain was kept on glycerol at -80°C while a work stock was kept at 4°C on slants of tryptic soy agar (TSA; Oxoid; Hampshire, UK) and MRS agar (Oxoid) for the strain of pathogens and LAB respectively. To prepare the inoculum for further experiments a with an inoculation loop culture was taken from the work stock and LAB strains were grown aerobically in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid) at 37 °C for 24 h whereas all pathogens were grown in Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid) at 37 °C for 24h.

Table 1: Overview of the pathogens and lactic acid bacteria strains used in the present study.

Strain	This study number	LFMFP UGent number	Culture collection number or unique coding	Origin
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lab1	1060	LMG6896T	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Lab2	1061	LMG6901	
<i>Lactobacillus sakei</i>	Lab3	583		Fermented sausage
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Lab4	1062		Yakult Shirota
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lab5	1063	LBC81	
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Ec1	990	ATCC 700728	Human, clinical
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Ec2	846	MB 3885	Beef carpaccio
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	Ec3	884	BRMSID 188	
<i>Escherichia coli</i> P1	Ec4	997	ATCC BAA-1427	Ground beef
<i>Escherichia coli</i> K12	Ec5		ATCC 23631	
<i>Escherichia coli</i> ESBL	Ec6		-	Pig carcass
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li1	447	LMG 23356	Jalisco cheese
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li2	905	12MOB089LM	Meat
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li3	906	12MOB098LM	Dairy
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li4	394	LMG 23194	Cheese
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li5	392	LMG 23192	Meat
<i>Listeria monocytogenes</i>	Li6	034	LMG 13305	Soft cheese
<i>Listeria innocua</i>	Li7	L030	ATCC 33090	
<i>Salmonella enterica</i> Thompson	Sa1	688	RM1987	Cilantro
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	Sa2	689	ATCC SL 1344	
<i>Salmonella enterica</i> monophasic Typhimurium	Sa3	1006		Pig carcass
<i>Salmonella enterica</i> Senftenberg	Sa4	1025	ATCC 43845	
<i>Salmonella enterica</i> Montevideo	Sa5	S1024	ATCC BAA 710	Tomato
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	Sa6	S1023	ATCC BAA 1045	Almond
<i>Enterococcus faecium</i>	Ee1	E996	NRRL B-2354	

2.2 Survival and growth at low temperature and assessment of acid tolerance

Three experiments were performed to evaluate the survival and tolerance of the LAB and pathogens' strains under adverse conditions. In the first experiment (Exp. I) LAB strains were exposed to cold storage during 0, 5, 9 and 14 days. LAB strains (ca. 1000 CFU/ml) were inoculated in triplicate in 24-well plates with MRS broth (1.8 ml per well) following the incubation in a temperature-controlled refrigerator at 7 and 12 °C \pm 1°C. These temperatures were chosen as they represent the reasonably foreseen range of storage temperature of yoghurt storage. The monitoring of survival or growth was carried out by plating on MRS agar.

In the second experiment (Exp. II) LAB and pathogens' strains were subjected to acid conditions at room temperature during 6 hours. LAB and pathogens' strains were grown twice for 24h in MRS and BHI broth at 37°C, respectively. After that, all strains were inoculated at a concentration of ca. 6 log CFU/mL in 24-well plates in MRS or BHI broth (1.8 ml per well) with pH adjusted to 3.5, 4.0 and 4.5 and incubated at 22 °C. These pH levels were chosen as they represent the range of acid pH of yoghurt (pH 3.5) up to minimum pH of growth of pathogens (pH 4.5). Samples were taken for plate count in MRS agar (LAB) or on TSA agar (pathogens) plates at 0, 2, 4 and 6 hours.

Finally, in the third experiment (Exp. III) all strains were subjected to acid conditions and cold storage simultaneously. All LAB and pathogens' strains were inoculated separately (200 μ l per well) in a concentration of ca. 6 log CFU/mL in 24-well plates with either MRS or BHI broth with pH adjusted to 4.5 (1.8 ml per well). The inoculated well plates were incubated at 7°C and 12 °C. Samples were taken for plate count in MRS agar (LAB) or TSA agar (pathogens) plates after 1, 7 and 14 days of incubation.

2.3 In vitro assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains

LAB strains were screened for their antimicrobial activity against the strains of *E. coli* O157, *Salmonella* and *L. monocytogenes* as well as the surrogate strains of generic *E. coli*, *L. innocua* and *Enterococcus faecium* using the standard agar well

diffusion assay and agar spot assay. To prepare the inoculum LAB strains were incubated twice in MRS broth at 37 °C for 24h while the pathogens strains were grown in BHI broth at 37 °C for 24 h.

2.3.1 Preparation of cell free supernatants

After incubation in MRS broth, LAB cells were removed by centrifugation at 5000 g for 20 min. The supernatants were recovered and filtered through membranes (0.22 µm pore size). The supernatants were divided in two fractions: the pH value of one fraction was adjusted to 6.5 with a sterile 1N NaOH solution. After that, acid (CFS) and neutralized (SFS) cell free supernatants were stored at 4 °C.

2.3.2 Agar well diffusion assay

Agar well diffusion assay was performed following a protocol previously described by Kamal et al. (2018); Venkadesan and Sumathi, (2015) and Georgieva et al. (2015). After incubation of the pathogenic strain in BHI broth at 37°C, 0.1 ml of the BHI culture was inoculated in 20 mL of selective agar medium: Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (XLD, Oxoid) for *Salmonella* spp.; Chromogenic Media (ALOA[®], bioMérieux) for *L. monocytogenes* and *L. innocua* ; Muller-Hinton for generic *E. coli* and *E. coli* O157 strains and Slanetz and Bartley medium (SB, Oxoid) for *Enterococcus faecium*. After the agar solidified, the plates were stored for 2 hours in a refrigerator. Four wells (8 mm diameter) were cut into agar plates and 30 µL of either neutralized (SFS) or acidified (CFS) supernatants were added in triplicate (in three wells) in a plate. BHI broth without inoculum was added in the fourth well as a negative control. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Antimicrobial activity was confirmed by measuring the clear zone around the wells using a Vernier caliper.

2.3.3 Agar spot assay

Agar spot assay was carried out as previously described by Schillinger and Lücke (1989) with minor modifications. In total 10 µL of MRS culture of LAB was spotted on the surface of MRS agar plates and incubated at 37 °C for 24 h. After that, 7

mL of soft Muller-Hinton agar containing the pathogenic or surrogate strain at a level of 1 % was poured over the plates. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Inhibition zones were checked by measurements of the diameter using a Vernier caliper.

2.4 Artisanal yoghurt preparation

One batch of yoghurt was prepared using commercial yoghurt to start fermentation process. Therefore, approximately 5 liters of commercial pasteurized milk bought in the local supermarket was heated at 85 °C for 5 min and cooled down to 45 °C. Next, 500 g of commercial standard yoghurt bought in the local supermarket containing the starter culture (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) were added to provoke acidification. The mixture was kept at 45 °C until reaching pH 4.6, followed by cooling down to 4 °C and storage at 4 °C for 24 h in sterile glass bottles (Figure 1 in supplementary material).

2.5 Probiotic supplementation and pathogens' survival, present as post-contamination, during storage of yoghurt

The yoghurt was divided in four batches with duplicate samples for each pathogen (*L. monocytogenes* (Li4), *S. enterica* Typhimurium (Sa2) and *E. coli* O157 (Ec3)) and both temperatures of storage (7 °C and 12 °C) tested (Figure 2 and 3 in supplementary material):

- i) batch I was a control batch with only starter culture,
- ii) batch II with starter culture and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* supplemented post-acidification,
- iii) batch III with starter culture and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* supplemented post-acidification and addition of a pathogen strain (either *L. monocytogenes* Li4 or *S. enterica* Typhimurium Sa2 or *E. coli* O157 Ec3),
- iv) batch IV with starter culture and addition of a pathogen strain (either *L. monocytogenes* Li4 or *S. enterica* Typhimurium Sa2 or *E. coli* O157 Ec3).

Probiotic' suspension containing *Lact. paracasei* subs. *paracasei* (La5) was prepared following as previously described by Scariot et al., (2018). The strain was grown in MRS broth at 37 °C for 24h. Then, overnight culture was centrifuged (1000 x g, 20

min, 4 °C), pellet was washed twice with 0.9 % saline buffer and suspended in 20 ml of UHT milk in a final concentration of 8 log CFU/mL.

The same process was performed to prepare pathogen' suspension. Each pathogen strain was grown in BHI broth at 37 °C for 24h. Then, the pellets were centrifugated, washed and suspended in 20 ml of UHT milk in a final concentration of 6 log CFU/mL.

In addition, all series were prepared to serve storage at two different temperatures (7 or 12 °C). Storage occurred up to 72 hours at 7 °C with sampling done after 0, 2, 4, 6, 24 and 72 hours. The same was done for samples stored at 12 °C.

Thus, monitoring in duplicate of the survival of 3 pathogens (and also including a non-inoculated control samples) at 2 storage temperatures resulted in the preparation of 48 glass bottles of 100 g of yoghurt (Figure 2 in supplementary material).

The plate counting was performed following the standard methods for pathogen and *Lact. paracasei* enumeration (refer to section 2.6).

2.6 pH measurements during yoghurt production and enumeration of pathogens and *Lactobacillus paracasei* during storage of yoghurt

The acidification during yoghurt production from pasteurized milk at 45°C was monitored by measurement of the pH at 0, 2, 4, 6, 24 and 72 hours after inoculation (via addition of the commercial standard yoghurt) using a glass electrode pH meter.

The sampling and plate counting were performed at 0, 2, 4, 6, 24 and 72 hours after inoculation following the standard methods: 10 g of sample plus 100 mL peptone H₂O was mixed and followed by preparation of ten-fold dilutions. After that, 100 µL of appropriate dilution was spread in selective agar medium. For *S. enterica* Typhimurium was used xylose-lysine-deoxycholate agar; Chromogenic Media for *L. monocytogenes* and MacConkey agar with sorbitol, cefixime and tellurite for *E. coli* O157:H7. All plates were incubated at 37 °C for 24 h.

Enumeration of *Lact. paracasei* subsp. *paracasei* in the yoghurt samples by plate counting was performed in selective medium (LC medium supplemented with a membrane- filtered sterile solution of 10 % (w/v) D (-) ribose (Sigma Aldrich) and 0.2 % (v/v) bromocresol green solution (Sigma Aldrich) and incubated at 30 °C for 48 hours as described previously by Ilha et al., (2015).

2.7 Statistical analysis

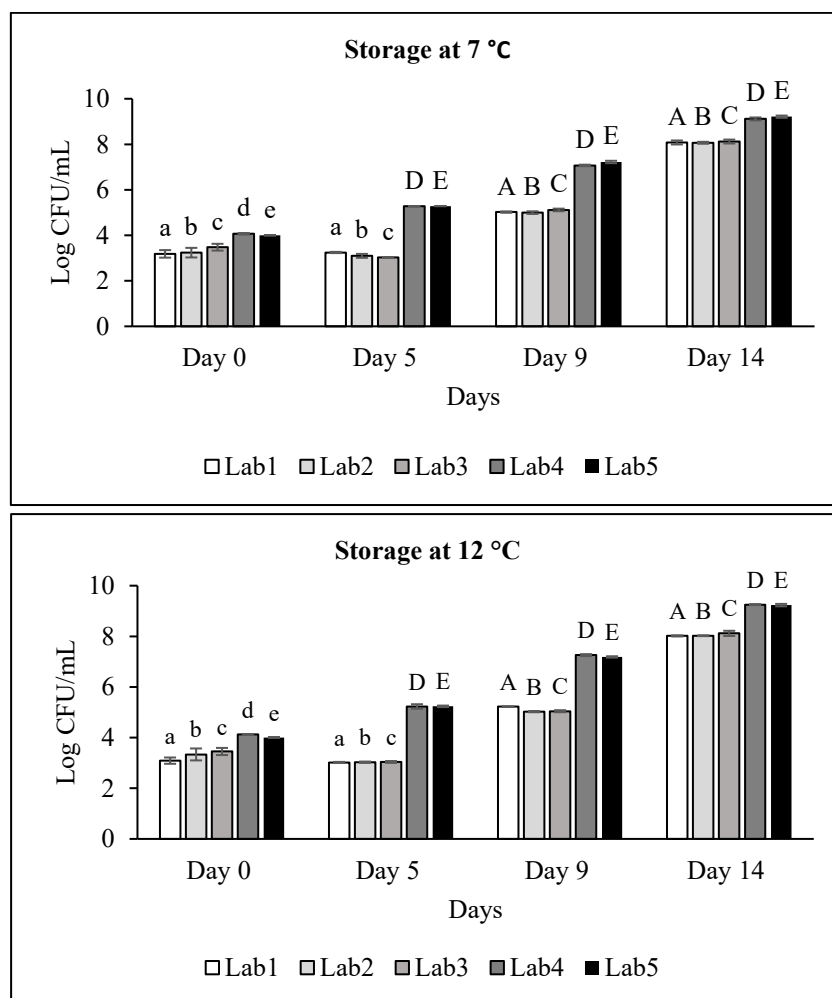
The results of antimicrobial activity were submitted to ANOVA analysis. Significant statistical differences were tested by *Tukey test* ($p < 0.05$). Antimicrobial effect by *Lact. paracasei* added as probiotic in artisanal yoghurt were submitted to Student's *t*-test ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed using *Statistica 7.0* software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3. Results

3.1 Survival and tolerance assessment

Three experiments were performed to evaluate the survival and tolerance of the LAB and pathogens strains at different conditions. In the first experiment, five LAB were submitted to cold storage at 7 °C and 12 °C. All strains were able to grow at three temperatures tested (Figure 1). LAB 1, LAB 2 and LAB 3 grew to levels over 8 log CFU/mL during 14 days. LAB 4 and LAB 5 showed the highest growth surpassing 9 log CFU/mL in the same time of storage.

Figure 1: Growth potential of lactic acid bacteria in MRS broth incubated at 7 and 12 °C. Each bar represents the mean value of three replicates. Columns labelled with upper case letters indicate that the values are significantly different from values at day 0 ($p < 0.05$).



In the second experiment, LAB and pathogens were submitted at acid conditions for 6 hours. All strains showed to tolerate the three acid conditions tested (Figure 2). LAB strains showed a reduction of 2 and 1 log CFU/mL in samples with pH 3.5 and pH 4.0 respectively, while in pH 4.5 all LAB strains were able to keep the bacterial concentration in 6 log CFU/mL. *Enterococcus faecium* count reduced in all pH tested. All *Salmonella* and *E. coli* strains showed similar results. Bacterial counts showed a reduction of 2 log CFU/mL approximately in samples with pH 3.5 and 4.0. In pH 4.5 the count keeps in 6 log CFU/mL after 6 hours. For *Listeria* strains, was observed an increase in bacterial counts in pH 4.0 and 4.5.

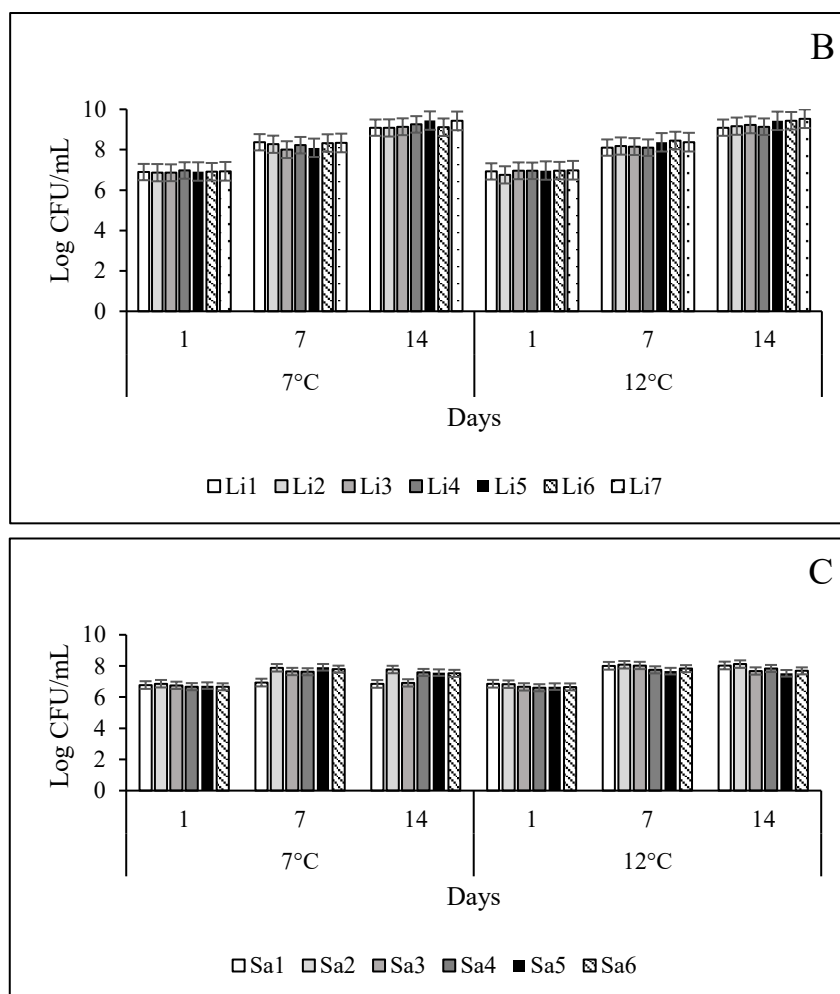
At least, acid condition and cold storage were applicated simultaneously in LAB and pathogens strains. All strains showed an increase of 1 or 2 log CFU/mL in bacterial concentration with exception of *Salmonella* strains that keep the concentration in 6 log CFU/mL when samples were storaged at 7 °C (Figure 3).

Table 2: Survival of lactic acid bacteria and *Enterococcus faecium* (log CFU.mL⁻¹) during 6h incubation at room temperature in MRS broth under acid conditions (pH 3.5; 4.0 or 4.5). The values represent the mean values (n = 3).

	pH 3.5				pH 4.0				pH 4.5			
	0h	2h	4h	6h	0h	2h	4h	6h	0h	2h	4h	6h
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6.59	3.49	4.57	4.58	6.63	5.67	5.60	5.69	6.65	6.43	5.61	5.64
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	6.50	6.24	5.63	5.58	6.52	5.59	5.62	5.63	6.50	6.52	7.05	7.13
<i>Lactobacillus sakei</i>	6.12	5.98	5.74	4.92	6.43	5.99	5.94	5.69	6.45	5.99	6.00	5.79
<i>Lactobacillus paracasei</i>	6.86	6.07	5.97	5.68	6.83	6.09	5.86	5.81	6.80	5.96	6.02	6.14
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	6.96	6.78	6.84	6.92	6.86	6.95	6.90	6.92	6.89	6.93	6.97	6.86
<i>Enterococcus faecium</i>	6.88	5.59	5.46	4.39	6.80	5.86	5.67	5.69	6.80	5.78	5.75	5.66

Table 3: Survival of pathogens strains (log CFU.mL⁻¹) during 6h incubation at room temperature in BHI broth under acid conditions (pH 3.5; 4.0 or 4.5). The values represent the mean values (n = 3).

	pH 3.5				pH 4.0				pH 4.5			
	0h	2h	4h	6h	0h	2h	4h	6h	0h	2h	4h	6h
<i>E. coli</i> O157 and generic <i>E. coli</i>												
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	6.74	5.04	5.28	4.99	6.73	6.61	5.28	4.99	6.76	6.72	6.79	6.74
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	6.65	5.16	4.99	4.9	6.73	6.62	4.99	4.9	6.83	6.93	6.66	6.32
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	6.60	5.99	4.93	3.72	6.52	6.33	4.93	3.72	6.87	6.81	6.61	6.45
<i>Escherichia coli</i> P1	6.84	5.81	4.29	3.76	6.83	6.25	4.29	3.76	6.68	6.46	6.24	5.95
<i>Escherichia coli</i> K12	6.51	5.68	4.41	4.13	6.66	6.74	4.41	4.13	6.57	6.73	6.6	6.33
<i>Escherichia coli</i> ESBL	6.49	5.96	4.13	3.92	6.60	6.51	6.4	5.96	6.6	6.51	6.4	5.96
<i>Salmonella</i> spp. strains and												
<i>Salmonella enterica</i> Thompson	6.81	5.15	4.73	3.59	6.9	6.56	5.31	4.67	6.84	6.69	6.51	6.01
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	6.93	4.99	3.9	2.67	6.92	6.09	5.06	3.58	6.84	6.72	6.66	6.48
<i>Salmonella enterica monophasic</i> Typhimurium	6.86	3.93	3.63	3.57	6.80	6.24	3.97	3.63	6.94	6.93	6.53	5.94
<i>Salmonella enterica</i> Senftenberg	6.62	4.26	3.99	3.59	6.57	4.55	4.01	3.66	6.83	6.79	6.57	6.23
<i>Salmonella enterica</i> Montevideo	6.63	3.92	3.88	3.58	6.82	4.55	4.23	3.9	6.72	6.77	6.77	6.39
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	6.78	3.63	3.58	3.57	6.75	4.43	3.74	3.63	6.84	6.76	6.56	6.22
<i>L. monocytogenes</i> strains and <i>L. innocua</i>												
<i>L. monocytogenes</i> LMG 23356	6.85	6.83	6.73	5.77	6.96	6.87	6.77	6.78	6.96	6.95	7.99	8.97
<i>L. monocytogenes</i> 12MOB089LM	6.89	6.99	6.98	6.91	6.94	7.05	8.17	8.20	6.96	8.05	9.14	9.24
<i>L. monocytogenes</i> 12MOB098LM	6.88	6.96	7.02	7.05	6.94	7.05	7.13	7.22	6.97	8.01	9.01	9.08
<i>L. monocytogenes</i> LMG 23194	6.90	6.89	6.77	6.63	6.90	6.94	7.89	8.02	6.95	8.08	9.1	9.09
<i>L. monocytogenes</i> LMG 23192	6.93	6.93	6.85	6.75	6.93	8.05	8.07	8.03	6.96	8.01	9.06	9.06
<i>L. monocytogenes</i> LMG 13305	6.86	6.95	6.94	6.97	6.98	8.07	8.09	8.10	6.94	8.05	9.09	9.10
<i>L. innocua</i> ATCC33090	6.81	6.90	6.99	7.04	6.94	7.02	8.04	8.10	6.94	8.01	9.01	8.85



3.2 In vitro antimicrobial activity of lactic acid bacteria

Five LAB strains were screened for their antimicrobial activity against twenty foodborne pathogens: *Enterococcus faecium*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *E. coli* strains using two different methods. The antimicrobial activity was expressed as the diameter of the inhibition zone (mm) and 5 mm as considered positive (Table 2).

All LAB strains showed antimicrobial effect against all pathogens tested using agar spot assay. Inhibition zones showed by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain (LAB 5) were significantly greater than other LAB strains (67% against *E. coli* strains; 72% against *Listeria* strains and 100% against *Salmonella* strains).

Agar well diffusion assay was used to evaluate the antimicrobial effect using cell free LAB extracts acidified (CFS) and neutralized – pH 6.5 (SFS). Cell free supernatants acidified from all LAB strains showed inhibition effect against all pathogens tested. *L.*

paracasei subsp. *paracasei* (LAB 5) showed the largest inhibition zones with significant statistic difference. LAB 5 cell free supernatant acidified was positive in 67%, 84%, 90% and 100% against *E. coli* strains, *Salmonella* strains, *Listeria* strains and *Enterococcus faecium*, respectively.

Cell free supernatants LAB were neutralized and screened against all pathogens. For *Enterococcus faecium* none inhibition zone was observed. While for *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria* strains, all LAB SFS showed antimicrobial effect. LAB 5 presented the larger inhibition zones when compared to the others too.

Acid and neutralized cell free supernatants were able to inhibit the growth of pathogens. Significant statistical differences between zones of inhibition were observed between CFS and SFS. CFS showed larger zones when compared to SFS.

Table 4: Screening of selected lactic acid bacteria strains for antimicrobial activity against the main foodborne pathogens by agar spot assay (ASA) and agar well diffusion assay (AWD) using either acid cell free supernatant (CFS) or neutralized (pH 6.5) cell free supernatant (SFS). The threshold for established antimicrobial activity is a diameter of > 5mm; for each pathogen or surrogate strain the highest antimicrobial activity observed over the five LAB strains included is indicated in bold per test assay. (nd: not detected).

Bacteria	Diameter of the inhibition zone (mm)														
	<i>Streptococcus thermophilus</i>			<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>			<i>Lactobacillus sakei</i>			<i>Lactobacillus paracasei</i>			<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>		
	ASA	AWD		ASA	AWD		ASA	AWD		ASA	AWD		ASA	AWD	
	CFS	SFS		CFS	SFS		CFS	SFS		CFS	SFS		CFS	SFS	
<i>Salmonella</i> spp.															
<i>S. enterica</i> Thompson RM 1987	16.89	10.28	nd	16.9	10.37	6.76	21.17	11.60	7.12	25.27	15.42	8.58	34.81^a	16.57^b	9.02^c
<i>S. enterica</i> Typhimurium ATCC SL1344	17.40	9.63	nd	22.50	10.52	6.88	21.82	12.68	7.32	25.27	15.68	8.75^c	34.81^a	15.93^b	7.72
<i>S. enterica</i> monophasic Typhimurium	16.88	10.64	nd	21.59	10.37	6.93	22.08	12.27	8.11	27.42	15.98	8.74	27.80^a	16.16^b	9.12^c
<i>S. enterica</i> Senftenberg ATCC 43845	15.08	15.45	nd	23.67	11.79	6.74	22.17	13.82	7.43	28.31^a	16.04	8.49	25.63	16.39^b	9.26^c
<i>S. enterica</i> Montevideo ATCC BAA710	16.73	9.41	nd	25.49	10.61	6.73	23.05	12.76	7.43	25.61	16.00^b	9.17	28.01^a	15.57	9.55^c
<i>S. enterica</i> Enteritidis ATCC BAA1045	16.55	15.88^b	nd	24.89	11.11	6.60	22.17	12.72	7.27	26.01^a	15.66	9.18	25.64	15.57	9.87^c
<i>Listeria</i> spp.															
<i>L. monocytogenes</i> LMG 23356	18.48	13.23	nd	25.60	15.37	7.41	26.69	14.72	7.07	25.47	16.88^b	8.24^c	30.35^a	16.79	8.21
<i>L. monocytogenes</i> 12MOB089LM	17.23	12.38	nd	15.12	14.69	6.40	23.41	14.44	7.09	25.47	15.60	8.22	30.35^a	16.40^b	8.27^c
<i>L. monocytogenes</i> 12MOB098LM	17.51	12.26	nd	18.60	15.39	6.29	29.93^a	15.72	7.20	29.63	15.51	8.19	26.00	15.77^b	8.48^c
<i>L. monocytogenes</i> LMG 23194	16.42	12.56	nd	22.23	15.68^b	6.09	25.28	15.60	7.15	25.59	15.64	8.15	26.38^a	15.10	8.37^c
<i>L. monocytogenes</i> LMG 23192	18.96	11.63	nd	14.33	15.31	6.20	17.60	14.45	7.25	25.80^a	15.63	8.14	25.41	16.50^b	8.81^c
<i>L. monocytogenes</i> LMG 13305	12.44	12.54	nd	14.91	15.67	6.98	15.44	15.99	7.27	23.39	15.36	8.17	24.67^a	16.60^b	8.37^c
<i>L. innocua</i> ATCC33090	21.57	12.52	nd	23.25	14.25	7.22	18.22	15.20	7.12	16.45	16.35	8.06	27.69^a	16.60^b	8.45^c
<i>Escherichia</i> spp.															
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 700728	13.03	10.44	nd	15.40	15.70^b	8.27	15.45	15.43	7.46	20.39	15.53	8.65	25.22^a	15.58	9.19^c
<i>E. coli</i> O157:H7 MB 3885	14.61	11.98	nd	20.88	15.84^b	8.33	19.54	15.49	7.21	20.39^a	15.53	8.88^c	25.22	15.58	8.50

<i>E. coli</i> O157:H7 BRMSID 188	10.85	10.34	nd	16.53	14.37	8.16	25.84^a	14.75	7.20	23.60	15.61^b	8.84^c	23.74	14.19	8.36
<i>E. coli</i> P1 ATCC BAA 1427	11.82	11.94	nd	17.88	12.20	8.74	26.22^a	13.58	7.75	24.32	15.85^b	8.60	25.46	14.72	8.87^c
<i>E. coli</i> K12 ATCC 23631	10.60	13.56	nd	17.43	13.73	8.86	22.05	14.85	7.95	25.55	16.22^b	9.02^c	27.09^a	15.63	8.88
<i>E. coli</i> ESBL	10.80	10.20	nd	10.47	11.51	8.85	14.76	15.61^b	7.85	19.46	15.50	8.63	20.42^a	15.36	9.41^c
<i>Enterococcus</i> sp.															
<i>E. faecium</i> NRRL B2354	20.28	11.18	nd	21.83^a	12.47	nd	16.97	12.24	nd	16.12	15.6^b	nd	12.89	15.29	nd

3.3 Antimicrobial activity of *Lactobacillus paracasei* in artisanal yoghurt

Biocontrol effect of probiotic strain against foodborne pathogens was evaluated in artisanal yoghurt samples. The samples were inoculated with different pathogens in a final concentration of 6 log CFU/mL and co-inoculated or not with *L. paracasei* subsp. *paracasei* followed by storage at 7 °C and 12 °C.

L. paracasei subsp. *paracasei* probiotic strain was able to reduce the pathogens counts over time. The first reduction effect of *E. coli* O157:H7 was observed after 2 hours in artisanal yoghurt with probiotic strain at 7 °C and 12 °C compared with 6 hours in normal yoghurt sample. Significant differences in *E. coli* O157:H7 counts with or without probiotic strain were observed in 2h, 4h, 6h and 72 hours at 7 °C and 24 h and 72 hours at 12 °C (Figure 4A).

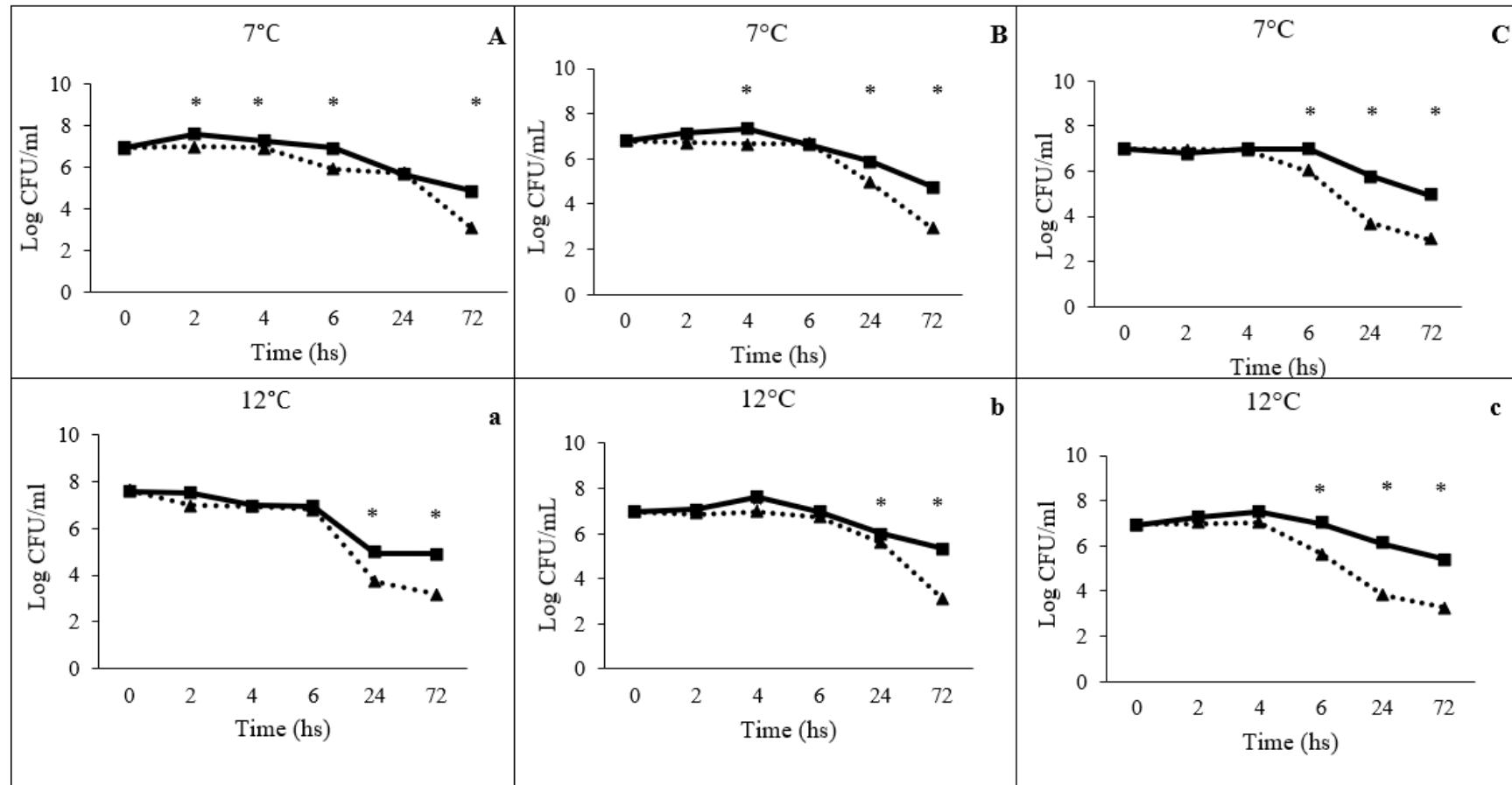
Significant reductions in *S. enterica* Typhimurium counts were observed after 4 h, 24 h and 72 hours (Figure 4B). About 4 log CFU/mL of *S. enterica* Typhimurium was eliminated in the presence of *L. paracasei* subsp. *paracasei* after 6 h of storage at both temperatures tested compared with 1 log CFU/mL of reduction at the same time in yoghurt without probiotic strain.

L. monocytogenes counts showed significant reduction after 4 h, 6 h, 24 h and 72 hours when stored at 12 °C and after 6 h, 24h and 72 h at 7 °C (Figure 4C).

L. paracasei subsp. *paracasei* probiotic strain showed to be able to reduce pathogens at considerable levels in artisanal yoghurt samples. Furthermore, enumeration of *L. paracasei* subsp. *paracasei* remained a high level (about 8 log CFU/mL) after 72 hours of storage in all artisanal yoghurt samples (Table 3).

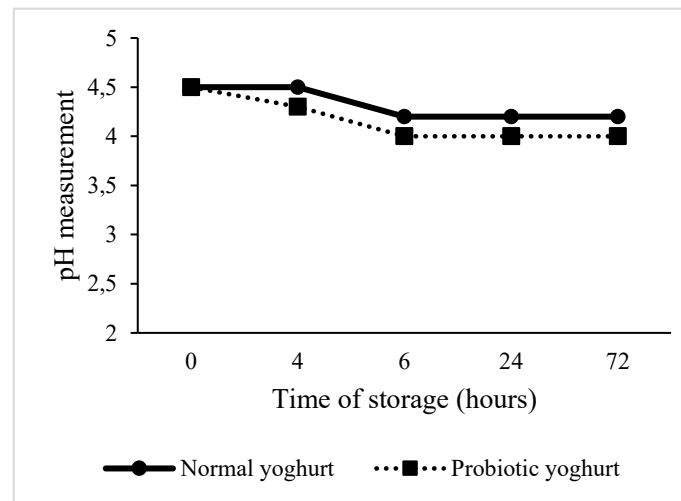
The pH in both probiotic and normal yoghurt samples was not show significant difference (Figure 5). However, probiotic yoghurt was able to acidify faster than normal yoghurt.

Figure 4: Reduction effect of co-inoculation with *L. paracasei* subsp. *paracasei* probiotic strain during yoghurt production (using standard starter cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) and against the three selected foodborne pathogens inoculated in the yoghurt sample as post-contamination and during further storage at 7°C (A-B-C) and 12°C (D-E-F). (A/a) *E. coli* O157H7 BRMSID188; (B/b) *S. enterica* Typhimurium ATCC SL 1344; (C/c) *L. monocytogenes* LMG 23194.



(▲) Triangles represent the pathogens enumeration (CFU/mL) in yoghurt samples co-inoculated with probiotic strain, while (■) represent the pathogens enumeration without co-inoculation of the probiotic strain. * represents significant difference ($p > 0.05$) assessed by Student's t-test and thus significant different pathogen enumeration in yoghurt samples with or without co-inoculation sampled at the same time point.

Figure 5: pH measurements in normal (●) and probiotic (■) yoghurt samples during time of storage at 7 and 12°C.



4. Discussion

The use of biocontrol agents, i.e. the use of protective cultures such as lactic acid bacteria (LAB) and/or their extracellular compounds have been considered to avoid the proliferation of pathogens microorganisms in food matrix (Jesus et al., 2016; Kamal et al., 2018; Nikodinoska et al., 2019; Oliveira et al., 2018). In our work, we proposed the use of probiotic strain as protective culture against pathogens in artisanal yoghurt samples.

Firstly, we submitted separately lactic acid bacteria and pathogens strains to similar processing and storage conditions of artisanal yoghurt. We investigated the capability of the strains to survival at cold storage and acid conditions.

Acid environments are not considered optimal conditions to grow pathogen bacteria. However, some authors have investigated the survival of foodborne pathogens in acidic foods like mayonnaise, salad dressing, cottage cheese and yoghurt (Ahmed and Shimamoto, 2014; Bachrouri et al., 2006; Mcingvale et al., 2000; Goel et al., 1971; Tsai and Ingham, 1997; Akkaya et al., 2015; Elizaquível et al., 2012; Inatsu et al., 2004). For example, EHEC has been documented in food with pH ranging of 4.5 to 9.0 (Glass, K. A. et al., 1992). In our work, all pathogens tested were able to survival at acid pH. The strains were inoculated in a high level and in pH 4.5 all strains were able to keep the bacterial concentration during 6 hours. There is an increase in bacterial counts at pH 4.0 and 4.5 in *Listeria* spp. counts. Mcingvale et al., (2000) showed that pathogens were able to be cultured from a 40-day stored acidic yoghurt sample. Other studies showed that *E. coli* 0157:H7 strains were able to survive under acidic conditions (pH 4.0 to 4.5) for 30 to 40 days (Goel et al., 1971; Tsai and Ingham, 1997).

Pathogens bacteria are classified into mesophiles, psychrotrophs or thermophiles according to the range of temperature at which can grow. The lowest temperature at which the bacteria can survive and multiply is its minimum growth temperature. *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* are mesophiles which generally grow between 8°C and 45 °C in lab media or foods. *Listeria monocytogenes* are psychotropic bacteria able to grow between 0 °C and 45 °C (Danyluk and Schaffner, 2011; Koukkidis et al., 2017; Ziegler et al., 2019). Refrigeration temperatures (7 °C or less) frequently are considered safe to avoid proliferation of pathogens. However, some authors have been associated survival of pathogens with refrigerate products (Danyluk and Schaffner, 2011; Koukkidis et al.,

2017; Mcegan et al., 2019). Others showed that survival of pathogens like *E. coli* O157:H7 is favored by acidic condition and low temperatures (Berry and Foegeding, 1997; Tsai and Ingham, 1997). We observed similar results when submitted the pathogens strains to acid condition and cold storage simultaneously. There was an increase in bacterial count showing that the combination of both conditions may favor the multiplication of pathogenic microorganisms.

LAB strains were able to grow and multiply at low temperatures and acid pH when inoculated in culture medium. They are recognized as thermophiles and mesophiles microorganisms with optimal growth temperature of 30 °C to 37 °C and 45 °C to 50°C respectively. However, these strains have been shown capability to adapt to environments with adverse conditions such as low pH and temperature. (Carr et al., 2002; Ferrando et al., 2015). In our work, LAB strains were able to survive and multiply in all cold storage and acid conditions evaluated. The use of LAB strains in food industry represents a multi-billion dollar industry being cheese and yoghurt products as the most produced food commodities (De Vos, 2011). LAB strains are extremely versatile and for this reason are widely used in food industry (FERREIRA, 2003). Besides that, some LAB strains are known as probiotic microorganisms, defined as “live microorganisms that when administrated in adequate amounts, confer health benefits to the host” (Hill et al., 2015; Scariot et al., 2018). Besides the health benefits, these microorganisms have shown antimicrobial properties against the growth of several pathogens. These properties are associated with the production of organic acids, bacteriocins and/or hydrogen peroxide. Species of *Lactobacillus* are well documented with probiotic properties and antimicrobial activity. In our work, we evaluated the antimicrobial activity of five LAB strains *in vitro* by two different methods. Antimicrobial activity is an important criterion for selection of probiotic culture and biocontrol agent (Georgieva et al., 2015). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* presented the best antagonistic effect against the most pathogens using agar spot assay and agar well diffusion. The production of lactic acid during the fermentation process reduces pH of the media, which is known to inhibit the growth of most foodborne pathogens. The antagonistic effect is also due to the undissociated form of the acid and its capacity to reduce intracellular pH, leading to inhibition of vital cell functions (Georgieva et al., 2015; Kivanc et al., 2011). When we used cell free supernatants neutralized, by agar well diffusion assay, we eliminate the putative effect of produced organic acids. The antimicrobial activity presented is probably due the

production of others inhibitor substances, such as hydrogen peroxide and bacteriocins. Similar results were obtained by Kamal et al., (2018). The authors showed that *L. rhamnosus* was able to significantly inhibit in vitro growth of *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* Typhimurium. Venkadesan and Sumathi, (2015) reported that 10 LAB-isolated were able to inhibit the growth of *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* e *Listeria monocytogenes*. The authors suggest that the antimicrobial activity against gram-positive pathogens like *Listeria* spp. is mainly due to the bactericidal effect of protease sensitive bacteriocins. For gram-negative pathogens, the effect could be attributed to the production of organic acids and hydrogen peroxide (De Vuyst and Leroy, 2007; Georgieva et al., 2015).

From the results obtained in the evaluation of antimicrobial activity in vitro, we observed that *L. paracasei* subsp. *paracasei* showed the best antagonistic effect against most of the pathogen strains evaluated. Therefore, we evaluated the ability of this strain to act as a biocontrol agent in artisanal yoghurt samples against three different pathogens. The results were compared with regular yoghurt sample (without *L. paracasei* subsp. *paracasei*). We also evaluate two storage temperatures of artisanal yoghurt considering that temperature fluctuations may occur during manufacturing and storage processes. *L. paracasei* subsp. *paracasei* probiotic strain showed to be able to reduce pathogens at considerable levels in artisanal yoghurt samples. Similar results were obtained by others authors using diverse LAB strains. Kamal et al., (2018) reported antimicrobial effect by *L. rhamnosus* against three foodborne pathogens in yoghurt samples. Carlos et al., (2019) showed the effect of sakacin-producing *L. sakei* against *L. monocytogenes* in fish juice. Akbar et al., (2019) confirmed the effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from fermented milk products against *S. Typhimurium* and *E. coli* strains.

5. Conclusion

L. paracasei has been well documented as a probiotic microorganism and for its technological and antimicrobial properties has been widely used in different food matrices. This study suggested that *L. paracasei* subs. *paracasei* can act as a food biocontrolling agent. The data showed that *L. paracasei* subs. *paracasei*, supplemented after fermentation process, was able to reduce pathogens at considerable levels in artisanal

yoghurt samples. These findings can support the use of lactic acid bacteria and/or its extracellular compounds as an efficient strategy to prevent foodborne outbreaks especially in developing countries and artisanal products. Further studies are necessary to evaluate if probiotic supplementation before fermentation process could be better and the mechanism of biocontrol effect.

CONFLICTS OF INTEREST: none

REFERENCES

- Ahmed, A.M., Shimamoto, T., 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 168–169, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.014>
- Akbar, A., Sadiq, M.B., Ali, I., Anwar, M., Muhammad, J., Shafee, M., Ullah, S., Qasim, S., Ahmad, S., Anal, A.K., Akbar, A., Sadiq, M.B., Ali, I., Anwar, M., Muhammad, J., Shafee, M., Ullah, S., Gul, Z., Qasim, S., 2019. fermented milk products and its antimicrobial potential. *CyTA - J. Food* 17, 214–220. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1575474>
- Akkaya, L., Kara, R., Muduroglu, R., Sagdic, O., 2015. Survival of *Listeria monocytogenes* in Ayran, a traditional Turkish fermented drink. *MLJEKARSTVO* 65, 130–137.
- Bachrouri, M., Quinto, E.J., Mora, M.T., 2006. Kinetic parameters of *Escherichia coli* O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. *Int. Dairy J.* 16, 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.06.002>
- BERRY, E.D., FOEGEDING, P.M., 1997. Cold Temperature Adaptation and Growth of Microorganisms. *J. Food Prot.* 60, 1583–1594. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.12.1583>
- Carlos, J., Peres, C., Bover-cid, S., Bolívar, A., Zurera, G., Pérez-rodríguez, F., 2019. Modelling the interaction of the sakacin-producing *Lactobacillus sakei* CTC494 and *Listeria monocytogenes* in filleted gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under modified atmosphere packaging at isothermal and non-. *Int. J. Food Microbiol.* 297, 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.002>

- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., 2002. The Lactic Acid Bacteria : A Literature Survey 28, 281–370.
- Cutrim, C.S., de Barros, R.F., da Costa, M.P., Franco, R.M., Conte-Junior, C.A., Cortez, M.A.S., 2016. Survival of *Escherichia coli* O157: H7 during manufacture and storage of traditional and low lactose yogurt. *LWT - Food Sci. Technol.* 70, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.047>
- Danyluk, M.D., Schaffner, D.W., 2011. Quantitative assessment of the microbial risk of leafy greens from farm to consumption: Preliminary framework, data, and risk estimates. *J. Food Prot.* 74, 700–708. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-373>
- De Vos, W.M., 2011. Systems solutions by lactic acid bacteria: From paradigms to practice. *Microb. Cell Fact.* 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S2>
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13, 194–199.
- Elizaquível, P., Sánchez, G., Aznar, R., 2012. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157 : H7 , *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control* 25, 704–708. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.003>
- Ferrando, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J., Suárez, V., 2015. Resistance of functional *Lactobacillus plantarum* strains against food stress conditions. *Food Microbiol.* 48, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.005>
- FERREIRA, C.L.D.L.F., 2003. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*.
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N., 2015. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29, 84–91.
- Gillespie, I.A., McLauchlin, J., Grant, K.A., Little, C.L., Mithani, V., Penman, C., Lane, C., Regan, M., 2006. Changing pattern of human listeriosis, England and Wales, 2001-2004. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1361–1366. <https://doi.org/10.3201/eid1209.051657>

- Glass, K. A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P., Doyle, M.P.D., 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. . *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2513–2516.
- Goel, M.C., Kulshrestha, D.C., Marth, E.H., Francis, D.W., Bradshaw, J.G., Read, R.B., 1971. FATE OF COLIFORMS IN YOGURT, BUTTERMILK, SOUR CREAM, AND COTTAGE CHEESE DURING REFRIGERATED STORAGE. *J. Milk Food Technol.* 34, 54–58. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-34.1.54>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., 2015. STATEMENTS The International Scientific Association for 11. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Ilha, E.C., Scariot, M.C., Treml, D., Pereira, T.P., Anna, E.S.S., Prudêncio, E.S., Arisi, A.C.M., 2015. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. *Ann. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1137-7>
- Inatsu, Y., Bari, M.L., Kawasaki, S., Isshiki, K., 2004. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7 , *Salmonella* Enteritidis , *Staphylococcus aureus* , and *Listeria monocytogenes* in Kimchi 67, 1497–1500.
- Jesus, A.L.T., Fernandes, M.S., Kamimura, B.A., Prado-Silva, L., Silva, R., Esmerino, E.A., Cruz, A.G., Sant’Ana, A.S., 2016. Growth potential of *Listeria monocytogenes* in probiotic cottage cheese formulations with reduced sodium content. *Food Res. Int.* 81, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.030>
- Kamal, R.M., Alnakip, M.E., Abd, S.F., Aal, E., Bayoumi, M.A., 2018. Bio-controlling capability of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* against some common foodborne pathogens in yoghurt. *Int. Dairy J.* 85, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.007>
- Kivanc, M., Yilmaz, M., Cakir, E., 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *TURKISH J. Biol.* 35, 313–324. <https://doi.org/10.3906/biy-0906-67>
- Koukkidis, G., Haigh, R., Allcock, N., Jordan, S., Freestone, P., 2017. Salad leaf juices enhance *Salmonella* growth, colonization of fresh produce, and virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.02416-16>
- Mcegan, R., Dunn, L.L., Danyluk, M.D., 2019. Survival of *Salmonella* on Lemon and

- Lime Slices and Subsequent Transfer to Beverages 39, 154–161.
- Mcingvale, S.C., Chen, X.Q., Mckillip, J.L., Drake, M.A., 2000. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in buttermilk as affected by contamination point and storage temperature. *J. Food Prot.* 63, 441–444. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.4.441>
- Nikodinoska, I., Ba, L., Di, D., Manso, B., García-sánchez, L., Melero, B., Rovira, J., 2019. LWT - Food Science and Technology Protective cultures against foodborne pathogens in a nitrite reduced fermented meat product 101, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.022>
- Oliveira, M., Ferreira, V., Magalhães, R., Teixeira, P., 2018. Biocontrol strategies for Mediterranean-style fermented sausages. *Food Res. Int.* 103, 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.048>
- Rivera-reyes, M., Campbell, J.A., Cutter, C.N., 2019. Survival of acid-adapted and non-adapted Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using an in vitro model. *Food Control* 104, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.009>
- Scariot, M.C., Venturelli, G.L., Prudêncio, E.S., Carolina, A., Arisi, M., 2018. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 264, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.021>
- Schillinger, U., Lücke, F.K., 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901–1906.
- Thuy, V.T., Lo, R., Bansal, N., Turner, M.S., 2018. Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Control* 85, 472–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.036>
- Tsai, Y.W., Ingham, S.C., 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in Acidic condiments. *J. Food Prot.* 60, 751–755. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.7.751>
- Venkadesan, D., Sumathi, V., 2015. Screening of lactic acid bacteria for their antibacterial activity against milk borne pathogens. *Int. J. Appl. Res.* 1, 970–973.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products 96, 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.016>

Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R., Guldemann, C., 2019. International Journal of Food Microbiology Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads : Impact of food matrix , storage temperature and storage time. Int. J. Food Microbiol. 296, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.016>

CAPÍTULO IV
DEVELOPMENT OF SPECIFIC PRIMERS FOR DETECTION OF
***Lactobacillus paracasei* by qPCR**

* Artigo submetido para a Revista *Food Bioscience* em 2020

SCARIOT, M. C.; VENTURELLI, G. L.; JUSTIN, K. S.; ARISI, A. C. M. Development of specific primers for detection of *Lactobacillus paracasei* by qPCR.

Development of specific primers for detection of *Lactobacillus paracasei* by qPCR

Mirella Crhistine Scariot, Gustavo Luiz Venturelli, Kelly Justin da Silva, Ana Carolina Maisonnave Arisi*

*CAL CCA UFSC, Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil.

* Corresponding author.

E-mail address: ana.arisi@ufsc.br (A.C.M. Arisi).

ABSTRACT

Lactobacillus paracasei has often been added to several foods due to its probiotic potential and the numerous technological properties it presents. The enumeration of microorganisms belonging to the *L. casei* group (*L. paracasei*, *L. casei* and *L. rhamnosus*) in dairy products is considered problematic due to the phenotypic characteristics and similar nutritional requirements. Recently, the use of quantitative PCR for the quantification of *L. paracasei* has been proposed, having as target gene the 16S, rRNA, groL or tuf genes. The objective of the present work was to develop species-specific primers for the detection and quantification of *L. paracasei*. From a BLAST search, regions were selected and specificity confirmed by in silico alignment analyzes. Seven pairs of primers were designed and tested in different concentrations by qPCR assays using different bacterial strains as positive and negative controls. qPCR assays with the LpNTR1, Lap1 and Lsei3 primers did not show amplification in any of the conditions tested. qPCR with the LpNTR2 and Lap2 primers showed amplification in at least one of the reactions, but with late Cq values. The pair of tuf primers previously designed presented results similar to those observed by the authors. The assay with the Lsei1 and Lsei2 primers showed satisfactory amplification results. It was possible to establish two pairs of species-specific primers for the detection of *L. paracasei* by qPCR.

Keywords: *Lactobacillus paracasei*. qPCR. Specific primer. Bacterial enumeration.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (BAL) are often associated with food production and preservation, as they are capable of rapid acidification and improvement of sensory characteristics, such as taste and texture. Thus, they are used as starter or complementary cultures in cheeses, yogurts, fermented vegetables, fermented meats, salami, wine and beer production, sourdough and silage (CORBO et al., 2014; DE VUYST; LEROY, 2007; MANI- LÓPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2014).

In addition, BAL has been recognized as probiotic microorganisms, which when ingested in adequate amounts confer benefits to the health of the host (PAROLO et al., 2011; FAO / WHO, 2006). Among BAL, *Lactobacillus paracasei* has been frequently added to several foods due to the probiotic potential and the numerous technological properties that it presents (CHIANG; PAN, 2012; PATRIGNANI et al., 2006; VINDEROLA et al., 2009).

Probiotic enumeration is extremely important. Despite this, the enumeration of BAL in dairy products is considered problematic when the use of classical cultivation-dependent techniques is proposed due to the extremely similar phenotypic characteristics (GARCIA-CAYUELA et al., 2009; KAO; LIU; SHYU, 2007).

In this context, the search for fast and accurate analytical techniques are important for the identification, monitoring and enumeration of these microorganisms. As an alternative, there are independent cultivation methods, which are based on direct analysis of DNA or RNA extracted from the food matrix, such as qPCR (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013). The technique stands out for its high efficiency, reliability of results, high yields, an automated system, the advantage of not requiring post-reaction procedures, and the risk of contamination, which becomes extremely low, since the reaction and analysis are carried out in confinement (MARIA LOPEZ-CALLEJA et al., 2013).

In microbiological analysis, the use of qPCR has solved some drawbacks that are found in classic culture-dependent techniques and has been widely used for the detection and quantification of microorganisms present in food. Diverse studies have demonstrated that qPCR has become a powerful tool for the detection and quantification of lactic acid bacteria, especially those belonging to the *L. casei* group, as these are difficult to be distinguished and quantified by classical microbiology techniques.

Few studies have reported qPCR assays for quantification of *L. paracasei* (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013). Some qPCR assays targeting the 16S rRNA, groL or tuf genes have been mentioned for the quantification of *L. paracasei* (FURET; QUÉNÉE; TAILLIEZ, 2004; POSTOLLEC et al., 2011). Furet; Quénée; Tailliez (2004) did not specify the specificity of the primers for *L. paracasei*, while Falentin et al., (2010) observed cross amplifications of the primers targeting the groL, tuf and 16S rRNA genes with species strictly related to *L. paracasei*: *L. rhamnosus* and *L. casei*.

Among the targets proposed for BAL differentiation, the tuf gene has been shown to be highly variable (less conserved) between species of lactic acid bacteria, especially those with similar characteristics, such as the species of the *L. casei* group, and has therefore been considered an interesting target for detecting sequences of members of the genus *Lactobacillus* (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013; YU et al., 2012).

The present study aimed to develop new *species-specific primers for the specific detection and quantification of Lactobacillus paracasei*.

2. Material and Methods

2.1 Bacterial samples and culture conditions

Lactobacillus paracasei CCT 7501, *Lactobacillus paracasei* FNU, *Lactobacillus paracasei* LYO 750, *Lactobacillus casei* INCQS 500006 and *Lactobacillus casei* CCT 0566 were grown in De Man, Rogosa and Sharp broth (MRS) at 30°.

Other bacterial strains used as negative reaction controls (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* spp., *Bacillus subtilis* ATCC 6051 and *Bacillus cereus* ATCC 14579) were grown as previously described by Ilha et al., (2015).

The growth of bacterial cultures was monitored through optical density at 600 nm using Hitachi U2910 Spectrophotometer (Tokyo, Japan).

2.2 Bacterial DNA extraction

For the extraction of DNA from samples of pure bacterial cultures, 1.5 ml aliquots of sample were centrifuged at 10.000 rpm for 2 min, the supernatant discarded and the bacterial precipitate stored at -80 °C until the moment of DNA extraction.

Bacterial precipitates of gram-negative samples were resuspended in 100 µL of ultrapure water, frozen at -80 °C for 20 min and immediately heated in water at 100 °C for 10 min (PEREIRA et al., 2014). The cell suspension was cooled to room temperature and centrifuged (13,000 g/10 s). Afterwards, the supernatants were used for DNA extraction using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit method (Promega, WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

For the extraction of bacterial DNA from gram-positive samples, DNAzol® method developed by Achilleos; Berthier (2013) was used following the modifications described by Scariot et al., (2018). At the end, the samples were stored at -20 °C for the next steps.

2.3 DNA quantification

DNA concentrations were determined in NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Delaware, USA), where the concentration is estimated by measuring the sample's absorbance at 260 nm and 280 nm.

2.4 Primer design

In order to select a DNA sequence for species-specific detection of *L. paracasei*, a BLAST search was performed using the complete genome of the *L. paracasei* strain (GenBank accession number CP002391.1). Some regions were selected and the specificity was confirmed by in silico alignment analyzes.

Seven pairs of primers were designed (LpNTR1, LpNTR2, Lap1, Lap2, Lsei1, Lsei2 and Lsei3) using the software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) and tested in different concentrations. The sequences of the designed and synthesized primers were not presented because they are data that have not yet been published.

The pair of tuf primers previously designed by Achilleos; Berthier (2013) was also used targeting the Tu factor (tuf) gene (Table 1). The primers were synthesized by IDT (Coralville, IA, USA).

Table 1: Primer set designed and tested to detection and specific quantification of *L. paracasei* by qPCR.

Target gene	Primer pair	Concentration (nmol L ⁻¹)	Reference
<i>Elongation factor Tu</i>	tufF	300, 350	(Achilleos, Berthier, 2013)
	tufR	150, 200, 250	
<i>Nitroreductase</i>	LpNT1F	200, 300	This study
	LpNTR1R	200, 300	
<i>Nitroreductase</i>	LpNTR2F	200, 300	This study
	LpNTR2R	200, 300	
<i>Hypothetical protein 1</i>	Lap1F	200, 300, 400	This study
	Lap1R	200, 300, 400	
<i>Hypothetical protein 2</i>	Lap2F	200, 300, 400	This study
	Lap2R	200, 300, 400	
<i>Mannose / fructose / acetyl galactosamine system</i>	Lsei1F	100, 300, 500	This study
	Lsei1R	100, 300, 500	
<i>Mannose / fructose / acetyl galactosamine system</i>	Lsei2F	100, 300, 500	This study
	Lsei2R	100, 300	
<i>Mannose / fructose / acetyl galactosamine system</i>	Lsei3F	100, 300	This study
	Lsei3R	100, 300	

2.5 qPCR reactions

qPCR reactions were performed in plates containing 96 wells and with a final volume of 25 μ L. 12.5 μ L of SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) was used, the volume corresponding to the concentration of the forward primer “F” and the reverse primer “R”, 2 μ L of template DNA (corresponding to 10 ng) and water to complete the volume to 25 μ L.

The amplification reactions occurred in triplicate under the following conditions: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 40 cycles: 15 seconds at 94 °C and 1 min at 60 °C. The qPCR runs were analyzed using the software's automatic settings. The reactions were performed on the ABI PRISM 7500 equipment (Applied Biosystems).

3. Results and Discussion

3.1 Bacterial DNA extraction

The yield and quality of DNA extracted from samples of gram-positive and gram-negative bacteria are shown in Tables 2 and 3, respectively.

Table 2: Mean yield and quality of bacterial DNA extracted from gram-positive samples.

Sample	Yield*ng/ μ L	A 260/280
<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	1484,8	1,9
<i>Lactobacillus paracasei</i> FNU	928,9	1,9
<i>Lactobacillus paracasei</i> LYO 750	236,8	1,9
<i>Lactobacillus casei</i> INCQS 500006	800,5	1,9
<i>Lactobacillus casei</i> CCT 0566	4509,8	1,9

* Mean (n=2)

Table 3: Mean yield and quality of bacterial DNA extracted from gram-negative samples.

Sample	Yield*ng/ μ L	A 260/280
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	366,4	1,9
<i>Pseudomonas spp.</i>	1522,8	1,8
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	13,7	1,9
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	69,2	1,9

* Mean (n=2)

In all DNA extractions, yields obtained were considered high and sufficient for the following stages of the analysis. In addition, the quality of the extracted bacterial DNA can be observed through the ratio between the absorbance measurement at 260 and 280 nm. In all samples, a ratio ranging from 1.6 to 1.9 was observed. According to the literature, a DNA considered to be of good quality and free from interference has a ratio (A260 / 280) of approximately 1.8 (SOMMA; QUERCI, 2006), thus confirming that the protocols for bacterial DNA extraction used were satisfactory.

3.2 Specificity of initiators for specific detection of *Lactobacillus paracasei*

The specificity of the primer pairs designed and synthesized was tested by qPCR assay using different concentrations of primers and DNA extracted from strains of *L. paracasei* as positive samples and other bacterial species as negative controls.

No amplification was observed using the LpNTR1 primer pair for either positive or negative controls. When we tested the LpNTR2 primer pair, all *L. paracasei* strains showed a positive sign in 3 out of 3 reactions, however, all amplifications showed Cq considered late.

No amplification signal was observed using pairs of Lap1 primers and the pair of Lap2 primers showed amplification using 300 and 400 nmol L⁻¹ of each primer (forward and reverse), but all amplifications were nonspecific with late Cq values.

The primer pairs Lsei1, Lsei2 and Lsei3 target the gene responsible for the mannose-fructose-acetyl-galactosamine system. When Lsei3 primers were tested, no amplification signal was observed in all reactions and samples evaluated. The Lsei1 and Lsei2 initiators showed satisfactory results. When using the Lsei1 primers, there was an amplification signal in 2 of the 2 reactions tested with a mean Cq value of 17.43 for the positive control of *L. paracasei*, while the negative control samples did not show amplification. Likewise, when using Lsei2 primers, positive samples have an average Cq of 20.83 in the 2 reactions tested. The negative controls also showed no sign of amplification.

We also used the pair of *tuf* primers previously designed by (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013), which specifically amplified the genomic DNA of *L. paracasei*. The Cq values obtained for the samples of *L. paracasei* ranged from 18.90 to 19.90 and the Tm values ranged from 78.00 to 78.96. Other negative controls showed non-specific amplification with different late Cq and Tm values when compared to the *L. paracasei* Tm value of 78.30, confirming the specificity of the primer pair. *Pseudomonas* spp. and *E. coli* showed late Cq (Cq > 35 and Cq > 37.30) for 3 and 2 of 9 reactions, respectively.

Table 4: C_q and T_m values generated from the qPCR assay using the *tuf* primer pair and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target.

DNA sample	Mean C _q	Positive/Total	T _m
<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	19.48	9/9	78.16
<i>Lactobacillus paracasei</i> FNU	19.90	9/9	78.96
<i>Lactobacillus paracasei</i> LYO 750	18.90	9/9	78.18
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5	36.04	1/9	72.91
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	nd	0/9	71.82
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	38.30	2/9	77.95
<i>Pseudomonas</i> spp.	37.43	3/9	69.43
Starter culture (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> e <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>)	nd	0/9	73.51

^a10 ng of template DNA, nd means not detected with C_q> 40.

Table 5: Cq and Tm values generated from the qPCR assay using primer pairs LpNTR1 and LpNTR2 at concentrations 200 and 300 nmol L⁻¹ and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target.

DNA sample*	LpNTR1						LpNTR2					
	200 nmol L ⁻¹			300 nmol L ⁻¹			200 nmol L ⁻¹			300 nmol L ⁻¹		
	Mean Cq	Positive/Total	Tm	Mean Cq	Positive/Total	Tm	Mean Cq	Positive/Total	Tm	Mean Cq	Positive/Total	Tm
<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	nd	0/3	72.32	nd	0/3	70.13	35.64	3/3	76.77	35.98	3/3	76.88
<i>Lactobacillus paracasei</i> FNU	nd	0/3	77.99	nd	0/3	72.97	35.51	3/3	76.77	34.67	3/3	76.88
<i>Lactobacillus paracasei</i> LYO 750	nd	0/3	84.02	nd	0/3	78.39	37.01	3/3	76.65	35.71	3/3	76.50
<i>Lactobacillus casei</i> CCT 0566	nd	0/3	78.29	nd	0/3	77.95	35.95	3/3	70.31	35.97	3/3	72.57
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 5	nd	0/3	85.91	nd	0/3	79.15	nd	0/3	62.20	nd	0/3	62.12
<i>Bifidobacterium lactis</i> BB 12	nd	0/3	74.27	nd	0/3	73.91	33.68	3/3	65.85	36.09	3/3	78.96
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	nd	0/3	75.61	nd	0/3	71.58	36.72	3/3	65.07	36.26	3/3	79.65
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	nd	0/3	87.01	nd	0/3	86.65	38.63	1/3	75.06	38.35	1/3	73.47
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	0/3	86.52	nd	0/3	86.21	36.55	1/3	80.37	34.51	3/3	81.16
<i>Pseudomonas</i> spp.	nd	0/3	78.17	nd	0/3	70.57	34.01	1/3	65.68	33.35	3/3	77.00

*10 ng of template DNA, nd means not detected with Cq > 40.

Table 6: Cq and Tm values generated from the qPCR assay using the Lap1 and Lap2 primer pairs at concentrations 200, 300 and 400 nmol. L-1 and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target.

Primer	DNA sample	200 nmol L ⁻¹			300 nmol L ⁻¹			400 nmol L ⁻¹		
		Mean Cq	Positive/Total	Tm	Mean Cq	Positive/Total	Tm	Mean Cq	Positive/Total	Tm
Lap1	<i>Lactobacillus casei</i> CCT0566	nd	0/3	80.71	nd	0/3	69.37	nd	0/3	63.82
	<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	nd	0/3	86.15	nd	0/3	69.92	nd	0/3	62.8
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	0/3	84.81	nd	1/3	68.64	nd	0/3	73.52
	<i>Pseudomonas</i> spp.	nd	0/3	77.06	nd	0/3	63.70	nd	0/3	62.23
Lap2	<i>Lactobacillus casei</i> CCT0566	nd	0/3	73.58	37.44	2/3	68.39	37.74	2/3	68.27
	<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	nd	0/3	64.67	nd	0/3	66.69	39.49	1/3	68.39
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	0/3	70.47	nd	0/3	61.99	nd	0/3	65.34
	<i>Pseudomonas</i> spp.	nd	0/3	62.60	nd	0/3	65.04	38.29	1/3	65.28

*10 ng of template DNA, nd means not detected with Cq> 40.

Table 7: Cq and Tm values generated from the qPCR assay using primer pairs Lsei1, Lsei2 and Lsei3 at concentrations 100 and 300 nmol.L-1 and DNA samples extracted from different bacterial strains as a target.

Iniciadores	Amostra bacteriana*	100 nmol L ⁻¹			300 nmol L ⁻¹		
		Cq médio	Positivo/Total	Tm	Cq médio	Positivo/Total	Tm
Lsei1	<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	17,43	2/2	77,02	17,43	2/2	77,20
	<i>Lactobacillus casei</i> CCT0566	nd	0/2	86,63	nd	2/2	82,72
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	0/2	63,79	nd	2/2	68,64
Lsei2	<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	20,83	2/2	79,20	20,83	1/2	78,38
	<i>Lactobacillus casei</i> CCT0566	nd	0/2	86,63	nd	0/2	62,34
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	0/2	70,47	nd	0/2	61,99
Lsei3	<i>Lactobacillus paracasei</i> CCT 7501	nd	0/2	77,30	nd	0/2	62,71
	<i>Lactobacillus casei</i> CCT0566	nd	0/2	89,16	nd	0/2	65,97
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	nd	0/3	70,47	nd	0/2	62,87

*10 ng of template DNA, nd means not detected with Cq > 40.

4. Conclusion

Classical microbiological methods, known as culture-dependent methods, are used to identify and quantify lactic acid bacteria in food matrices. However, species belonging to the genus *Lactobacillus*, especially members belonging to the *L. casei* group (*L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) are difficult to be distinguished by classical methods, since they have similar nutritional and growth needs.

Thus, the replacement of classical microbiology by independent cultivation methods, especially those based on molecular approaches, has been growing significantly and gaining ground in food science. Quantitative PCR has represented the basic technique of independent culture methods.

In this context, the present work had as its main objective the development of species-specific primers capable of specifically identifying and distinguishing the *Lactobacillus paracasei* strain. Thus, these primers can be used to quantify this strain when present in foods, such as probiotic foods.

It was possible to design two pairs of primers that were species-specific for the detection of *L. paracasei*. These two pairs of primers target the gene responsible for the mannose / fructose / acetyl-galactosamine system. The Cq values obtained for the positive samples were satisfactory at the tested concentrations. In addition, the primer pairs did not show amplification for the negative control samples, confirming their specificity.

REFERENCES

ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286-295, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

ILHA, E.C., SCARIOT, M.C., TREML, D., PEREIRA, T.P., SANT'ANNA, E.S., PRUDENCIO, E.S., ARISI, A.C.M., 2016. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. *Annals of Microbiology* 66, 597-606.

CORBO, M. R. et al. Selection of promising lactic acid bacteria as starter cultures for sourdough: using a step-by-step approach through quantitative analyses and statistics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 9, p. 1772-1780, 2014.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

MANI-LOPEZ, E.; PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A. Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 2578-2590, 2014.

PAROLO, C. C. F. et al. Genetic diversity of *Lactobacillus paracasei* isolated from in situ human oral biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 105-113, 2011.

FAO/WHO. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: **Estudio FAO Alimentación y Nutrición**, Roma, 2006. 45 p. Disponível em: <FTP://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a512s00pdf>.

FALENTIN, H. et al. Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 10-19, 2010.

YU, J. et al. Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial *hsp60*, *pheS* and *tuf* gene sequences. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 6, p. 927-934, 2012.

CHIANG, S.S.; PAN, T.M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 903-916, 2012.

PATRIGNANI, F. et al. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 1-11, 2006.

VINDEROLA, G. et al. Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 171-174, 2009.

GARCIA-CAYUELA, T. et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6-7, p. 405-409, 2009.

KAO, Y.T.; LIU, Y.S.; SHYU, Y.T. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food Research International**, v. 40, n. 1, p. 71-79, 2007.

MARIA LOPEZ-CALLEJA, I. et al. Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 480-490, 2013.

FURET, J. P.; QUÉNÉE, P.; TAILLIEZ, P. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. **International Journal Food Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 197-207, 2004.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recentemente, a incorporação de microrganismos probióticos em produtos alimentícios tornou-se uma tendência crescente. Os consumidores tem procurado por alimentos que ofereçam satisfação, bem-estar e mais benefícios à saúde, além da função de nutrição.

Lactobacillus paracasei tem sido bem documentada como um microrganismo potencialmente probiótico e por suas propriedades tecnológicas e antimicrobianas tem sido amplamente utilizada em diferentes matrizes alimentares.

O monitoramento da viabilidade celular de microrganismos quando inseridos em matrizes alimentares é de extrema importância para garantir a qualidade e o padrão de identidade do produto. Assim, a busca por técnicas que sejam rápidas, sensíveis e precisas são importantes para a identificação, o monitoramento e a quantificação dos mesmos. Esse estudo propôs um ensaio PMA-qPCR para o monitoramento da viabilidade celular de *L. paracasei* em amostras iogurte probiótico durante o período de vida de prateleira do produto. Os resultados mostraram que o uso de PMA em conjunto com a técnica qPCR é uma poderosa ferramenta comparado com abordagens dependentes de cultivo para a quantificação rápida de células viáveis, especialmente de bactérias probióticas.

Este estudo também relatou a atividade antimicrobiana demonstrada por estirpes de *L. paracasei* contra os principais microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos. Os dados sugerem que o uso de *L. paracasei* e/ou de seus compostos extracelulares podem ser uma estratégia eficiente para prevenir surtos de origem alimentar em produtos artesanais e assim, manter a tradição e culturabilidade de produtos artesanais e familiares que são tão importantes em diversas regiões do mundo.

ANEXO A: Artigo publicado

International Journal of Food Microbiology 264 (2018) 1–7



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR



Mirella Christine Scariot, Gustavo Luiz Venturéli, Elane Schwinden Prudêncio, Ana Carolina Maisonnave Arisi*

CAL CGA UFSC, Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88084-001 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Propidium monoazide (PubChem CID: 3035529)

Keywords:

Lactic acid bacteria

Quantitative PCR

Bacterial enumeration

Propidium monoazide

PMA-qPCR

ABSTRACT

Propidium monoazide (PMA) coupled with qPCR has been successfully used for specific quantification of viable bacteria cells in diverse matrices food. The present study aimed to develop PMA-qPCR assay for quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt. *L. paracasei* grown in culture medium was submitted to heat treatment at 60 °C for different periods of time and probiotic yoghurt containing *L. paracasei* were prepared and stored at 4 °C for 30 days. The viable cells were quantified using qPCR and PMA-qPCR assays targeting *mf* gene and also by plate counting. Standard curves were prepared and mean efficiency obtained was 94% and 96% ($R^2 > 0.98$) to *L. paracasei* in culture medium and probiotic yoghurt stored one day, respectively. The limit of detection (LOD) for both samples was 10^3 genome copies, corresponding to 32.1 pg of DNA. For viable cells quantification, standard curves Cq versus log CFU were plotted using mean CFU by plate counting of *L. paracasei* grown in culture medium and probiotic yoghurt. Results obtained for *L. paracasei* heat-treated cells were concordant by PMA-qPCR and plate count, CFU decreased as the heat treatment time increased, while qPCR count remained constant. *L. paracasei* enumerations obtained by qPCR for probiotic yoghurt stored one day and 30 days were higher than enumerations by PMA-qPCR for the same samples. The plate count values were similar to CFU values obtained by PMA-qPCR. These results showed that PMA-qPCR is a powerful approach compared with culture-dependent methods for quantification of *L. paracasei* viable cells in yoghurt. PMA-qPCR allowed reliable obtained results much faster than plate counting.

1. Introduction

Yoghurt or similar matrices food have been commonly used as vehicle for the incorporation of probiotic microorganisms, defined as “live microorganisms that when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host” (Hill et al., 2014). To exert these benefits, the concentration of live probiotic bacteria needs to be approximately $6 \log$ CFU/mL at the time of product consumption (Roy, 2005). Lactic acid bacteria are commonly used as probiotic, and are often associated with food production and preservation, once they induce rapid acidification and improve sensory characteristics, such as taste and texture (Corbo et al., 2014; Leroy and De Vuyst, 2004; Mari-Lopez et al., 2014; Parolo et al., 2011). Species of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the most used ones (Morales Villarreal et al., 2013), especially *Lactobacillus paracasei* (Alonso Buriti and Isay Saad, 2007; Chiang and Pan, 2012; Davis, 2014; Ilha et al., 2015; Patrignani et al., 2006; Vinderola et al., 2009).

Classical microbiological methods, also known as culture-dependent

methods, are used to identify and quantify *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species in food. For *Bifidobacterium*, there are selective culture media based on mupirocin which facilitate their enumeration (Vilkova et al., 2015), however differentiation of *Lactobacillus* species requires considerable effort based on selective media and colony morphology (Kao et al., 2007). Specific enumeration of genetically close related species belonging *L. casei* group (*L. paracasei*, *L. casei* and *L. rhamnosus*) is compromised due to the similarity in growth requirements and morphology (Tabasco et al., 2007). Differentiation of these species is difficult (Bottari et al., 2017) and their nomenclature and classification are subjects of recent discussion (Wuyts et al., 2017).

Culture-independent DNA-based methods have been used as an alternative to classical methods, mainly qPCR has been widely used for specific bacterial species detection and quantification in diverse food matrices (Cocolin et al., 2013; Garcia-Gayuela et al., 2009; Kao et al., 2007; Podeur et al., 2015). However, the inability of differentiation between viable and non-viable cells remains an important inconvenience, since qPCR amplifies free DNA able to persist in the

* Corresponding author.

E-mail address: anaarisi@ufsc.br (A.C.M. Arisi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.021>

Received 3 August 2017; Received in revised form 16 October 2017; Accepted 17 October 2017

Available online 18 October 2017

0168-1605/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

**ANEXO B: Certificado de apresentação oral na VI Semana Acadêmica de
Ciência e Tecnologia de Alimentos**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Pró-Reitoria de Extensão

Certificado

Certificamos que Mirella Crhistine Scariot
CPF 064.809.559-27

participou do(a) MOSTRA CIENTÍFICA DA VI SEMANA ACADÊMICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
realizado no período de 30/08/2017 a 31/09/2017

como Apresentador de Comunicação do(a) trabalho selecionado para apresentação oral pelo Comitê Científico, como autor principal
Carga horária: 1 hora

TÓPICOS ABORDADOS

Trabalho científico intitulado "QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *Lactobacillus paracasei* POR MONOAZIDA DE PROPÍDIO ACOPLADO À PCR QUANTITATIVA", de autoria de Mirella Crhistine Scariot, Helena de O. Santeli, Gustavo L. Venturelli, Ana Carolina Maisonnave Arisi.



Este certificado dispensa assinatura
UFSC - PROEX
Campus Reitor João David Ferreira Lima
Florianópolis - Santa Catarina - Brasil
CNPJ: 83.899.526/0001-82

Coordenador: Maria Manuela Caminho Feltes
Protocolo: 201707592

A autenticidade do documento pode ser verificada no site: <http://autenticidade.ufsc.br>, informando a chave: CERT-0697-1875-0849-2614

**ANEXO C: Certificado de premiação 1º lugar Apresentação Oral na VI
Semana Acadêmica de Ciência e Tecnologia de Alimentos**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

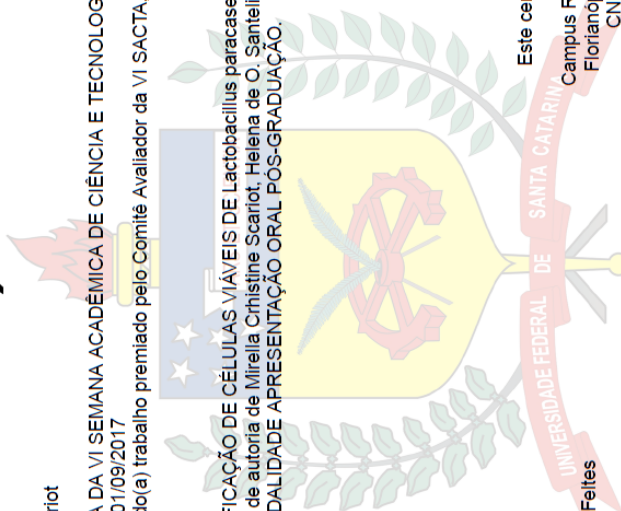
Pró-Reitoria de Extensão

Certificado

Certificamos que Mirella Crhistine Scariot
CPF 064.809.559-27
participou do(a) MOSTRA CIENTÍFICA DA VI SEMANA ACADÊMICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
realizado no período de 28/08/2017 a 01/09/2017,
como Apresentador de Comunicação do(a) trabalho premiado pelo Comitê Avaliador da VI SACTA, apresentado na forma oral
Carga horária: 1 hora

TÓPICOS ABORDADOS

Trabalho científico intitulado "QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VÍVEIS DE *Lactobacillus paracasei* POR MONOAZIDA DE PROPÍDIO ACOPLADO À PCR QUANTITATIVA", de autoria de Mirella Crhistine Scariot, Helena O. Santeli, Gustavo L. Venturilli; Ana Carolina Maisomave Arisi, apresentado na MODALIDADE APRESENTAÇÃO ORAL PÓS-GRADUAÇÃO.



Este certificado dispensa assinatura
UFSC - PROEX
Campus Reitor João David Ferreira Lima
Florianópolis - Santa Catarina - Brasil
CNPJ: 83.899.526/0001-82

Coordenador: Maria Manuela Camino Feltes
Protocolo: 201707592

A autenticidade do documento pode ser verificada no site: <http://autenticidade.ufsc.br>, informando a chave: CERT-0697-4498-0681-7189

ANEXO D: Registro como estudante internacional de doutorado na Universidade de Ghent

DEPARTMENT OF EDUCATIONAL POLICY REGISTRAR'S OFFICE

To whom it may concern

E studentenadministratie@ugent.be
T +32 9 331 00 99

Campus Ufo
Sint-Pietersnieuwstraat 33
9000 Gent

www.ugent.be

Certificate of registration as a guest student/exchange student

The Rector of Ghent University

confirms that	Mirella Scariot
student number:	01812923
born on:	27 July 1992 in Florianópolis, Santa Catarina
nationality:	Brazilian

is registered as a guest student/exchange student at the Faculty of Bioscience Engineering of Ghent University in the academic year 2018-2019.

From 01 October 2018 until 31 March 2019.

The Rector per pro



Piet Ruysinck
Head of Registrar's Office

ANEXO E: Submissão artigo científico Capítulo IV

24/04/2020

Gmail - Track your co-authored submission to Food Bioscience



Mirella Scariot <mirellascariot@gmail.com>

Track your co-authored submission to Food Bioscience

1 mensagem

Food Bioscience <Evisesupport@elsevier.com>
Responder a: Evisesupport@elsevier.com
Para: mirellascariot@gmail.com

2 de março de 2020 15:47

Dear Dr Scariot,

Submission no: FBIO_2020_254

Submission title: Development of specific primers for detection of Lactobacillus paracasei by qPCR

Corresponding author: Professor Ana Carolina Arisi

Listed co-author(s): Dr Mirella Scariot, Ms Gustavo Luiz Venturelli, Dr Kelly Justin da Silva

Professor Arisi has submitted a manuscript to Food Bioscience and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/FBIO?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Ffdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach22124292%23%2FFBIO%2Fsubmission%2FFBIO_2020_254&email=mirellascariot@gmail.com&firstName=Mirella&sumame=Scariot&country=Brazil&institution=UFSC&title=Dr

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Food Bioscience

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

http://www.evise.com/co-author/#/FBIO/unsubscribe/mirellascariot@gmail.com/5i3QOu0fg1w8QKD_GXNLF6zZTYVydK-wrZweH_3JRSfPOgYOSbvHbDg3U7RFhqduN2G0d3gt6BII_unbHM8QJQ